



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	การผลิตและตรวจสอบสมบัติของฟิล์มจาก <i>Anabaena</i> sp. Production and characterization of film from <i>Anabaena</i> sp.		
ชื่อนิสิต	นางสาวสุพิชญา วิริยะหิรัญไพบูลย์	เลขประจำตัว	6032156223
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์		
ปีการศึกษา	2563		

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การผลิตและตรวจสอบสมบัติของฟิล์มจาก *Anabaena* sp.

นางสาวสุพิชญา วิริยะหิรัญไพบูลย์

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2563

Production and characterization of film from *Anabaena* sp.

Miss Supichaya Wiriyahiranpaiboon

A Senior Project in Partial Fulfillment of the Requirements For
the Degree of Bachelor of Science in Botany Department of
Botany Faculty of Science, Chulalongkorn University Academic
Year 2020

ชื่อเรื่อง	การผลิตและตรวจสอบสมบัติของฟิล์มจาก <i>Anabaena</i> sp.
ชื่อนิสิต	สุพิชญา วิริยะหิรัญไพบูลย์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.วิชาณี แบนศิริ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชิษฐา สัจจาร์ักษ์
ปีการศึกษา	2563

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อนุมัติให้โครงการวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงการวิทยาศาสตร์

วิชาณี แบนศิริ

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร.วิชาณี แบนศิริ)

อัญชิษฐา สัจจาร์ักษ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชิษฐา สัจจาร์ักษ์)

ฉัตรทิพย์ รอดทัศน

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ฉัตรทิพย์ รอดทัศน)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การผลิตและตรวจสอบสมบัติของฟิล์มจาก <i>Anabaena</i> sp.
ชื่อนิสิต	สุพิชญา วิริยะหิรัญไพบุลย์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.วิชาณี แบนศิริ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชิษฐา สัจจาร์ภักษ์
ปีการศึกษา	2563

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันการใช้ประโยชน์ของพอลิเมอร์ชีวภาพรวมถึงพอลิแซคคาไรด์และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตในการทดแทนวัสดุจากปิโตรเลียมได้รับความนิยมอย่างกว้างขวางเนื่องจากระดับความตระหนักต่อสิ่งแวดล้อมเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามข้อจำกัดทางการค้าของพอลิเมอร์เหล่านี้ คือ ปริมาณการผลิตต่ำ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตพอลิแซคคาไรด์และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากไซยาโนแบคทีเรียภายใต้สูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน เพื่อวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของฟิล์มที่ขึ้นรูปจากพอลิเมอร์เหล่านี้ ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวงศักรวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายยีน 16S rDNA พบว่าไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Anabaena siamensis* โดยที่ไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตในสูตรอาหารเหลวของโบลต์ (BBM; 0.45 ± 0.07 กรัมต่อลิตร) ได้มากกว่าสูตรอาหารเหลวบีจี-11 ที่ปราศจากโซเดียมไนเตรท (BG-11₀; 0.21 ± 0.05 กรัมต่อลิตร) และสามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตและพอลิแซคคาไรด์ได้เท่ากับ 26.8 ± 3.9 and 48.2 ± 5.8 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 21 วันใน BBM ซึ่งสูงกว่า 2 เท่าของการเพาะเลี้ยงใน BG-11₀ (14.5 ± 3.5 และ 21.0 ± 4.2 มิลลิกรัมต่อลิตร, ตามลำดับ) ฟิล์มที่ได้จากการขึ้นรูปจากพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดได้ (1% โดยมวลต่อปริมาตร) โดยเทคนิคการหล่อฟิล์มจากสารละลาย มีสมบัติการส่องผ่านของแสงยูวีต่ำ และฟิล์มที่ได้จากการขึ้นรูปของพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้ (0.35% โดยมวลต่อปริมาตร) โดยการผสมกับคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (1.5% โดยมวลต่อปริมาตร) มีสมบัติการส่องผ่านของแสงอย่างยอดเยี่ยม ซึ่งการส่องผ่านของแสงเป็นสมบัติหนึ่งที่มีความสำคัญในการประยุกต์ใช้งานด้านบรรจุภัณฑ์

คำสำคัญ: *Anabaena* sp., ไซยาโนแบคทีเรีย, พอลิแซคคาไรด์, พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต, ฟิล์มชีวภาพ

ชื่อเรื่อง	Production and characterization of film from <i>Anabaena</i> sp.
ชื่อนิสิต	Supichaya Wriyahiranpaiboon
ภาควิชา	Botany
สาขาวิชา	Botany
อาจารย์ที่ปรึกษา	Dr. Wichanee Bankeeree
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	Assistant professor Dr. Anchittha Satjarak
ปีการศึกษา	2020

Abstract

In the present day, utilization of biopolymers including polysaccharide (PS) and polyhydroxybutyrate (PHB) as the substitutions of petroleum-based materials has gained widespread attention, as the level of environmental consciousness increases. However, the bottleneck in commercialization of these polymers is the low production yield. Therefore, the aims of this study were to investigate the productions of PS and PHB of a cyanobacterial isolate cultured in different media, and to analyze the physical properties of films casted from these polymers. Results from morphological study and phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequences suggested that this cyanobacterial isolate was closely related to *Anabaena siamensis*. This cyanobacterium grew faster in bold's basal medium (BBM; 0.45 ± 0.07 g/L) than in BG-11 medium, which lacked sodium nitrate (BG-11₀; 0.21 ± 0.05 g/L). The highest PHB and PS yields were 26.8 ± 3.9 and 48.2 ± 5.8 mg/L, after 21-day cultivation in BBM, which were about 2-fold higher than those of BG-11₀ (14.5 ± 3.5 and 21.0 ± 4.2 mg/L, respectively). The film obtained from solvent casting using PHB (1% w/v) exhibited low transmission of UV. Similarly, the composite film obtained from PSs (0.35% w/v) blended with carboxymethyl cellulose (1.5% w/v) also showed excellent optical properties, which light transmission is one of an important property for packaging applications.

Keywords: *Anabaena* sp., cyanobacteria, polysaccharide, polyhydroxybutyrate, bioplastic

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิทยาสตรฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของผู้ที่เกี่ยวข้องทุกฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.วิชาณี แบนศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิทยาสตร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชิษฐา สัจจารักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิทยาสตรร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา ให้กำลังใจตลอดการทำโครงการวิทยาสตร ช่วยตรวจสอบแก้ไขโครงการวิทยาสตรฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ฉัตรทิพย์ รอดทัศนาก ที่กรุณาเสียสละเวลาเป็นกรรมการสอบโครงการวิทยาสตร พร้อมทั้งให้คำแนะนำ ช่วยตรวจสอบแก้ไขให้โครงการวิทยาสตรฉบับนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสนับสนุนงบวิจัย

ขอขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้เชื้อไฮยาโนแบคทีเรีย สารเคมี อุปกรณ์และสถานที่สำหรับการศึกษาวิจัยในโครงการวิทยาสตรนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่กรุณาให้ใช้อุปกรณ์และสถานที่สำหรับการศึกษาวิจัยในโครงการวิทยาสตรนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกคนที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดการทำโครงการวิทยาสตร

ขอขอบพระคุณสมาชิกทุกท่านในหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา ให้กำลังใจและช่วยเหลือตลอดการทำโครงการวิทยาสตร

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ญาติพี่น้องและเพื่อนฝูง ที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจตลอดมา

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญรูป.....	ฅ
สารบัญตาราง.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. การตรวจสอบเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
3. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา.....	12
4. ผลการศึกษา.....	19
5. อภิปรายผลการศึกษา.....	28
6. สรุปผลการวิจัย ปัญหาและข้อเสนอแนะ.....	33
เอกสารอ้างอิง.....	35
ภาคผนวก.....	40
ภาคผนวก ก.....	41
ภาคผนวก ข.....	42

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1. โครงสร้างโมเลกุลของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต.....	6
2.2. กระบวนการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต.....	7
3.1. วิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต.....	17
4.1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>Anabaena</i> sp.....	19
4.2. การตรวจสอบขนาดความยาวดีเอ็นเอของ <i>Anabaena</i> sp. ด้วยเทคนิค เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	21
4.3. แผนภูมิวงศัวัณวิวัฒนาการของ <i>Anabaena</i> spp. ที่สร้างจากลำดับดีเอ็นเอ เครื่องหมายยีน 16S rDNA ด้วยวิธี Maximum likelihood (GTR+I+G) โดย มีตัวเลขที่ชี้ว่าซึ่งบ่งบอกความน่าจะเป็นของค่า bootstrap จากวิธี maximum likelihood และวิธี Bayesian inference ตามลำดับ.....	22
4.4. การเจริญเติบโตของ <i>Anabaena</i> sp. เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 21 วัน.....	23
4.5. สีของ <i>Anabaena</i> sp. ในอาหารเหลวที่ต่างกัน ณ วันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง.....	23
4.6. ลักษณะสารละลายจากการสกัดพอลิแซคคาไรด์ภายนอกเซลล์.....	24
4.7. สารสกัดจาก <i>Anabaena</i> sp.....	25
4.8. โครงสร้างเบื้องต้นของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต ด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี.....	26
4.9. फिल्मที่มีสารสกัดจาก <i>Anabaena</i> sp. เป็นองค์ประกอบ.....	27

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1. เปรียบเทียบคุณสมบัติทางกายภาพระหว่างพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต และพอลิโพรไพลีน.....	8
4.1. ผลการ BLASTn ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>Anabaena</i> sp. เปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รายงานในฐานข้อมูลของ GenBank.....	21
4.2. ค่าเฉลี่ยน้ำหนักของสารสกัดจาก <i>Anabaena</i> sp. เมื่อเพาะเลี้ยง ในอาหารที่ต่างกัน.....	25

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความเป็นมาและความสำคัญ

ปัจจุบันระดับความตระหนักต่อสิ่งแวดล้อมที่มีเพิ่มสูงขึ้น พลาสติกชีวภาพจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการทดแทนพลาสติกจากปิโตรเลียม เพื่อลดปัญหาเกี่ยวกับการย่อยสลาย และการปล่อยแก๊สที่เป็นพิษออกสู่ชั้นบรรยากาศในกระบวนการกำจัดพลาสติก เนื่องจากขยะพลาสติกตามพื้นดินและแหล่งน้ำเป็นสาเหตุหนึ่งของภาวะโลกร้อน รวมถึงเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม โดยพอลิเมอร์จากวัตถุดิบชีวมวลที่สามารถย่อยสลายตามธรรมชาติ พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลากหลาย เช่น ไคตินและไคโตซานจากสัตว์ เซลลูโลส แป้งและเพกตินจากพืช แอลจินेटจากสาหร่ายสีน้ำตาล พูลูลูแลนจากจุลินทรีย์ (Mohamed, El-Sakhawy, and El-Sakhawy, 2020) รวมถึงพอลิเมอร์ในกลุ่มพอลิแซคคาไรด์ (Tiwari et al., 2019) และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากไซยาโนแบคทีเรีย (Ansari and Fatma, 2016)

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กจัดอยู่ในกลุ่มโพรคาริโอต ที่สามารถผลิตออกซิเจนให้แก่ชั้นบรรยากาศของโลกผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงได้ มักอยู่อาศัยตามแหล่งน้ำทั่วไปเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (Nienaber and Steinitz-Kannan, 2018) ต้องการสารอาหารต่ำ และเป็นสิ่งมีชีวิตโพรคาริโอตประเภทเดียวที่ดำรงชีวิตโดยใช้แสงและสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตไว้ภายในเซลล์ได้ (Balaji, Gopi, and Muthuvelan, 2013) ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้ เช่น *Nostoc muscorum*, *Nostoc punctiforme*, *Anabaena* sp. และ *Calothrix brevisseima* เป็นต้น (Ansari and Fatma, 2016) นอกจากนี้ไซยาโนแบคทีเรียกำลังได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตที่ใช้แสงในการดำรงชีวิต มีความหลากหลาย สร้างโมเลกุลที่มีความจำเพาะ และเป็นวัตถุดิบในหลาย ๆ อุตสาหกรรม เช่น อาหาร ผลิตภัณฑ์ที่มีไฟโคบิลิโปรตีน (phycobiliprotein) เป็นส่วนประกอบอาหารสัตว์ เครื่องสำอาง บำบัดน้ำเสีย รวมถึงพลังงานชีวภาพและพลาสติกชีวภาพ (Grewe and Pultz, 2012)

พอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) เป็นโมเลกุลประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ถูกนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการสร้างผลิตภัณฑ์ชีวภาพอย่างแพร่หลาย ไม่ว่าจะเป็นฟิล์มถนอมอาหาร นวัตกรรมสิ่งทอ และบรรจุภัณฑ์ประเภทอาหาร เนื่องจากไม่ก่อให้เกิดสารพิษและย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ (Mohamed, El-Sakhawy, and El-Sakhawy, 2020) โดยพบว่าไซยาโนแบคทีเรียสามารถสะสมพอลิแซคคาไรด์ได้ทั้งภายในเซลล์ และปล่อยออกสู่นอกเซลล์ ซึ่งมีโครงสร้างและหน้าที่ที่หลากหลาย จึงทำให้พอลิแซคคาไรด์จากไซยาโนแบคทีเรียได้รับความสนใจเพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในอุตสาหกรรม (Misha, 2020) นอกจากนี้ Tiwari และคณะ (2019) รายงานว่า *Anabaena* sp. CCC 745 สามารถผลิตพอลิแซคคาไรด์ภายในและภายนอกเซลล์เท่ากับ 174.5 และ

145.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ในอาหารเหลว บีจี-11 (BG-11) ที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (polyhydroxybutyrate) เป็นพอลิเอสเทอร์ที่อยู่ในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคานอเอต (polyhydroxyalkanoates) และเป็นพอลิเมอร์ประเภทเดียวในกลุ่มที่สังเคราะห์ได้จากการใช้แสงในการดำรงชีวิต พบได้ในแบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรียบางชนิด โดยพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตกำลังได้รับความสนใจในการประยุกต์ใช้งานด้านพลาสติกชีวภาพ เนื่องจากสามารถย่อยสลายตามธรรมชาติได้ มีสมบัติการต้านทานน้ำและสมบัติทางกายภาพใกล้เคียงกับพอลิโพรไพลีน (polypropylene) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์จากปิโตรเลียมที่นิยมนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ (Price et al., 2020) จึงทำให้พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นพลาสติกชีวภาพ เช่น บรรจุภัณฑ์อาหาร ถุงเพาะชำพืช เสื้อผ้าและอุปกรณ์ด้านการแพทย์ เป็นต้น (Sirohi et al., 2020) โดยการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากไซยาโนแบคทีเรียกำลังได้รับความสนใจ เนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตที่ดำรงชีวิตโดยการใช้แสง (autotrophic organism) ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งในการลดต้นทุนการผลิต จากเดิมที่ศึกษาในสิ่งมีชีวิตที่ดำรงชีวิตโดยการใช้สารอินทรีย์เป็นอาหาร (heterotrophic organisms) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าข้อจำกัดของการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต คือปริมาณการผลิตต่ำ (Price et al., 2020) โดย Ansari และ Fatma (2016) รายงานว่า *Anabaena variabilis* สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้ร้อยละ 1.94 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเพาะเลี้ยง 21 วัน ในอาหารเหลวบีจี-11 ที่ปราศจากโซเดียมไนเตรต (BG-11₀)

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีความสนใจในการสกัดสารพอลิแซคคาไรด์และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่เตรียมจาก *Anabaena* sp. ภายใต้สูตรอาหารที่แตกต่างกัน เพื่อมาขึ้นแผ่นฟิล์มและตรวจสอบสมบัติทางกายภาพของฟิล์ม เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาพัฒนาการผลิตฟิล์มทางชีวภาพทดแทนการใช้พลาสติกจากปิโตรเลียมในอนาคต

1.2. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการผลิตพอลิแซคคาไรด์และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจาก *Anabaena* sp. ภายใต้สูตรอาหารที่แตกต่างกัน และวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของฟิล์มที่ขึ้นรูปจากพอลิเมอร์เหล่านี้

1.3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย ที่มีความสามารถในการสร้างสารพอลิแซคคาไรด์และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต รวมถึงฟิล์มจากพอลิแซคคาไรด์และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดได้ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้งานด้านบรรจุภัณฑ์ทดแทนการใช้พลาสติกจากปิโตรเลียมในอนาคตได้

บทที่ 2

การตรวจสอบเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1. ไชยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria)

ไชยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กจัดอยู่ในกลุ่มโพรคาริโอต เนื่องจากไม่มีนิวเคลียส และโครงสร้างภายในเซลล์ไม่มีโครงสร้างที่ถูกล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้มฟอสโฟลิพิด (phospholipid membranes) หรือออร์แกเนลล์ (organelles) แต่มีโครงสร้างเรียบง่ายซึ่งล้อมรอบด้วยชั้นของโปรตีน (Nienaber and Steinitz-Kannan, 2018) และเม็ดแกรนูลที่กักเก็บสารประกอบให้แก่เซลล์ เช่น ไชยาโนไฟซิน (cyanophycin) พอลิฟอสเฟต (polyphosphate) ไกลโคเจน (glycogen) และพอลิไฮดรอกซี-บิวทิเรต (polyhydroxybutyrate) (Bertocchi et al., 1990) ไชยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีผนังเซลล์คล้ายคลึงกับแบคทีเรียแกรมลบ กล่าวคือมีชั้นของเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan layer) และเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) ล้อมรอบเยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) นอกจากนี้อาจจะมีหรือไม่มีเมือกหุ้ม (sheath) ปกคลุมเซลล์ก็ได้ (Bhatnagar and Bhatnagar, 2019) แต่ไชยาโนแบคทีเรียสามารถดำรงชีวิตจากการสังเคราะห์ด้วยแสงและให้ออกซิเจนด้วยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ โดยมีรงควัตถุที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์ด้วยแสง ได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ (chlorophyll a) เป็นสารสีเขียว และไฟโคบิลิโปรตีน (phycobiliprotein) ซึ่งประกอบด้วยไฟโคไซยานิน (phycocyanin) เป็นสารสีเขียวแกมน้ำเงิน แอลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin) เป็นสารสีน้ำเงิน และไฟโคอีริทริน (phycoerythrin) เป็นสารสีแดง (Nienaber and Steinitz-Kannan, 2018)

2.1.1. การระบุชนิดของไชยาโนแบคทีเรีย

การระบุชนิดของไชยาโนแบคทีเรีย จำเป็นต้องทำให้ไชยาโนแบคทีเรียบริสุทธิ์ปราศจากเชื้ออื่นปนเปื้อน และตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมหรือข้อมูลทางชีวเคมี ไม่สามารถตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อระบุชนิดของไชยาโนแบคทีเรียเพียงอย่างเดียวได้ เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไชยาโนแบคทีเรียสามารถปรับเปลี่ยนได้ตามปัจจัยการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน (Rippka, 1988) ซึ่งส่วนใหญ่นิยมศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์เครื่องหมายยีน 16S rDNA เนื่องจากเป็นบริเวณยีนอนุรักษ์ (conserved gene) ที่ข้อมูลทางพันธุกรรมจะไม่สามารถเปลี่ยนแปลงตามความหลากหลายทางสรีรวิทยา (Callieri, Cronberg, and Stockner, 2012)

2.1.2. ประโยชน์ของไชยาโนแบคทีเรีย

ปัจจุบันไชยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่ได้รับความสนใจในกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตที่ดำรงชีวิตโดยการสังเคราะห์ด้วยแสง (autotrophic organisms) ซึ่งอาจมีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าการสร้างผลิตภัณฑ์จากสิ่งมีชีวิตที่ดำรงชีวิตโดยการใช้สารอินทรีย์เป็นอาหาร (heterotrophic organisms) อีกทั้งยังสามารถสร้างโมเลกุลที่เฉพาะเจาะจง หรือเป็นวัตถุดิบ

ในกระบวนการอุตสาหกรรมได้ ซึ่งการใช้ประโยชน์จากไซยาโนแบคทีเรียปัจจุบัน ได้แก่ อาหารผลิตภัณฑ์ที่มีไฟโคบิลิโปรตีน (phycobiliprotein) เป็นส่วนประกอบ อาหารสัตว์ เครื่องสำอาง ปุ๋ยชีวภาพ และการบำบัดน้ำเสีย นอกจากนี้เทคโนโลยีชีวภาพของไซยาโนแบคทีเรียที่กำลังได้รับแรงผลักดันคือด้านของพลังงานชีวภาพ (bioenergy) พลาสติกชีวภาพ (bioplastic) รวมถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive metabolites) (Grewe and Pulz, 2012)

2.2. อนุกรมวิธานและลักษณะสัณฐานวิทยาของสกุล *Anabaena*

Domain Bacteria

Kingdom Bacteria

Division Cyanophyta

Class Cyanophyceae

Order Nostocales

Family Nostocaceae

Genus *Anabaena*

Anabaena sp. เป็นไซยาโนแบคทีเรียประเภทเส้นสาย มีลักษณะเซลล์รูปร่างกลมจนถึงทรงกระบอกเรียงยาวต่อกันเพียงระนาบเดียว (uniseriate) ไม่มีการแตกแขนง (unbranched) มีการสร้างเซลล์พิเศษที่แตกต่างจากเซลล์ปกติ ได้แก่ heterocyte และ akinete (Rippka et al., 1979) โดยทั่วไปสืบพันธุ์ด้วยการหักเป็นท่อนแต่เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจะสร้าง akinete หรือเรียกอีกอย่างว่าเป็นระยะพักของเซลล์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ทั่วไปและมีการสร้างผนังเซลล์ให้หนาขึ้นจากการเก็บสะสมสารอาหารไว้ภายในและรักษาให้เซลล์คงอยู่ได้ เพื่อทำหน้าที่ในการสืบพันธุ์ โดยการแบ่งเซลล์ให้เส้นสายใหม่เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมอีกครั้ง heterocyte ซึ่งเป็นเซลล์พิเศษที่พบภายในเส้นสายมีลักษณะเซลล์ใหญ่กว่าเซลล์ทั่วไปและมีผนังหนา ซึ่งถูกสร้างขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ขาดไนโตรเจน โดยภายใน heterocyte จะมีเอนไซม์ไนโตรจีเนสทำหน้าที่ในการตรึงแก๊สไนโตรเจน (N_2) เพื่อเปลี่ยนเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่ไซยาโนแบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ (Nienaber and Steinitz-Kannan, 2018) โดยบริเวณขั้วของ heterocyte จะปรากฏเม็ดแกรนูลทั้งสองขั้วหรือเพียงด้านเดียวในกรณีที่ heterocyte อยู่ปลายสุดของเส้นสาย เม็ดแกรนูลนี้จะเก็บสะสมโปรตีนหรือที่เรียกว่าไซยาโนไฟซิน (cyanophycin) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกรดอะมิโน ได้แก่ กรดแอสพาร์ติกและอาร์จินีน (Haselkorn, 1978)

2.3. พอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide)

พอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide: PS) เป็นโมเลกุลประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างหลากหลาย ถูกสร้างขึ้นจากการเชื่อมต่อกันของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) ผ่านพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) โดยมีรูปร่างโมเลกุล (conformation) การจัดเรียงหมู่อะตอม (configuration) โครงสร้างที่เป็นกิ่งก้าน (branching) หรือการทำปฏิสัมพันธ์กับสารประกอบที่ไม่ใช่

คาร์โบไฮเดรตแตกต่างกัน ทำให้กลายเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ ที่มีโครงสร้างและหน้าที่ตามบทบาทการทำงานที่แตกต่างกันในแต่ละชนิดของสารประกอบ โดยทั่วไปพอลิแซคคาไรด์จะทำหน้าที่กักเก็บคาร์บอนเพื่อเป็นแหล่งพลังงานให้แก่เซลล์ รวมถึงประโยชน์ด้านอื่น ๆ เช่น รักษาความสมบูรณ์ของโครงสร้าง ทนต่อความเครียด และป้องกันสารพิษ เป็นต้น (Bhatnagar and Bhatnagar, 2019)

2.3.1. การสังเคราะห์พอลิแซคคาไรด์ของไซยาโนแบคทีเรีย

การสังเคราะห์พอลิแซคคาไรด์เกิดขึ้นภายในเซลล์ จากการเชื่อมกันของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งเกิดขึ้นบริเวณคาร์บอกซิโซม (carboxysome) โดยมีเอนไซม์ไรบูลอส 1,5 บิสฟอสเฟต-คาร์บอกซิเลสออกซีจีเนส (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: RuBisCo) ทำหน้าที่ตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ และเปลี่ยนเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตในวัฏจักรเคลวิน (Calvin cycle) (Nienaber and Steinitz-Kannan, 2018) โดยพบว่าไซยาโนแบคทีเรียสามารถสะสมพอลิแซคคาไรด์ไว้ในเซลล์และส่งสารดังกล่าวออกนอกเซลล์ได้ (Bhatnagar and Bhatnagar, 2019)

2.3.2. การสะสมพอลิแซคคาไรด์ของไซยาโนแบคทีเรีย

2.3.2.1. พอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์ (intracellular polysaccharide: IPS)

พอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์ หมายถึงพอลิแซคคาไรด์ที่สะสมภายในเซลล์ (storage polysaccharides) รวมถึงองค์ประกอบของผนังเซลล์ (cell wall polysaccharides) โดยพอลิแซคคาไรด์ที่สะสมภายในเซลล์ ได้แก่ ไกลโคเจน (glycogen) และแป้ง (cyanobacterial starch) สำหรับพอลิแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ คือ ลิโปพอลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ซึ่งมีประมาณ 70-75% ของบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) (Bhatnagar and Bhatnagar, 2019)

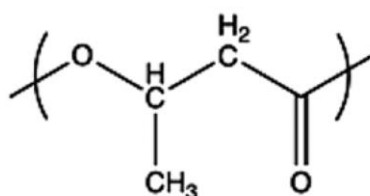
2.3.2.2. พอลิแซคคาไรด์ภายนอกเซลล์ (extracellular polysaccharide: EPS)

พอลิแซคคาไรด์ภายนอกเซลล์ หมายถึงพอลิแซคคาไรด์ที่ถูกส่งและสะสมภายนอกเซลล์ ซึ่งมีโครงสร้างหลากหลายและหน้าที่แตกต่างในแต่ละชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย (Bhatnagar and Bhatnagar, 2019) โดยสามารถพบพอลิแซคคาไรด์ภายนอกเซลล์ได้เมื่อไซยาโนแบคทีเรียอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น การขาดสารอาหาร สภาวะสิ่งแวดล้อมที่มีความเค็มสูงหรือความเข้มข้นแสงสูง โดยคาดว่า การผลิตพอลิแซคคาไรด์ออกมานอกเซลล์นั้นเป็นกระบวนการป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อมและต้านทานต่อสภาวะเครียดที่เกิดขึ้น (Phélippé et al., 2019) และพบองค์ประกอบพอลิแซคคาไรด์ภายนอกเซลล์หลายชนิด เช่น โพรตีน กรดยูโรนิก กรดไพรูวิก เมทิล อะซีทิลและหมู่ซัลเฟต ซึ่งรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อน รวมถึงน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส แมนโนส ไฮโลสและไรโบส (Parikh and Madamwar, 2006) นอกจากนี้พบว่าพอลิแซคคาไรด์ภายนอกเซลล์ มีความสามารถในการต้านการออกซิไดส์ได้จากการทดสอบผ่านกระบวนการการต้านทานอนุมูลอิสระ (Hydroxyl radical scavenging activity, HRSA) (Wang,

Wu, and Liu, 2014) อย่างไรก็ตามข้อมูลดังกล่าวเป็นเพียงผลการศึกษาจากไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น

2.4. พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (polyhydroxybutyrate)

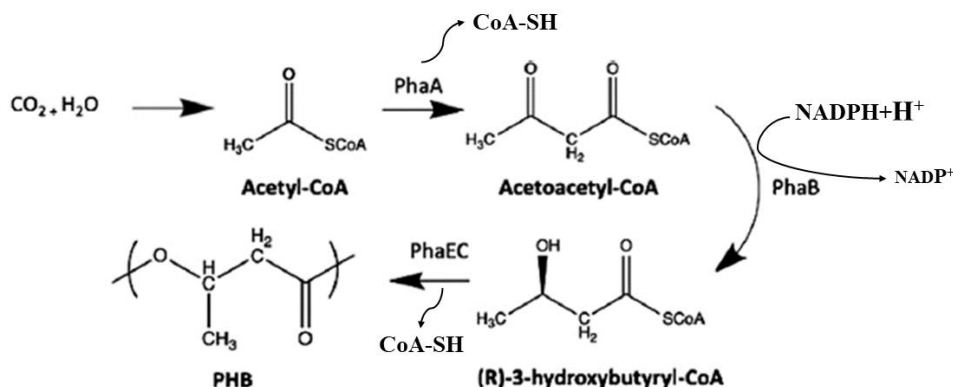
พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต เป็นหนึ่งในพอลิเอสเทอร์ที่จัดอยู่ในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอทชนิดความยาวสายสั้น (polyhydroxyalkanoates: PHAs) (Singh et al., 2017) ดังแสดงในรูปที่ 2.1 และเป็นพอลิเมอร์ประเภทเดียวในกลุ่มที่สามารถถูกสร้างขึ้นจากสิ่งมีชีวิตที่ดำรงชีวิตแบบสร้างอาหารได้เองโดยการใช้แสง (photoautotrops) ซึ่งโดยทั่วไปสามารถพบการสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้ในแบคทีเรียรวมถึงไซยาโนแบคทีเรีย (Price et al., 2020)



รูปที่ 2.1. โครงสร้างโมเลกุลของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Price et al., 2020)

2.4.1. การสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตทางชีวภาพ

กระบวนการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต ดังแสดงในรูปที่ 2.2 เริ่มต้นจากการเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยวัฏจักรเคลวิน (Calvin cycle) และเข้าสู่ขั้นตอนไกลโคไลซิส (glycolysis) ให้ได้ไพรูเวต (pyruvate) เพื่อถูกเปลี่ยนเป็นแอซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยขั้นตอนการสังเคราะห์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน และ 3 เอนไซม์ ขั้นตอนแรกเอนไซม์ PhaA (PHA specific β -ketothiolase) ทำหน้าที่เชื่อมแอซิติลโคเอนไซม์เอ 2 โมเลกุล ทำให้ได้แอซิติลแอซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetoacetyl-CoA) ขั้นตอนที่ 2 เอนไซม์ PhaB (Acetoacetyl-CoA reductase) ทำหน้าที่รีดิวซ์แอซิติลแอซิติลโคเอนไซม์เอ ทำให้ได้ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอ (hydroxybutyryl-CoA) ขั้นตอนที่ 3 เอนไซม์ PhaEC (PHB synthase) ทำหน้าที่สร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างหน่วยย่อยของไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอ เพื่อให้กลายเป็นพอลิเมอร์ของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต อย่างไรก็ตามนอกจากเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ โปรตีนชนิดอื่นที่มีความเกี่ยวข้องกับการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตในไซยาโนแบคทีเรียยังไม่เป็นที่เข้าใจแน่ชัด (Price et al., 2020)



รูปที่ 2.2. กระบวนการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Price et al., 2020; Singh et al., 2017)

2.4.2. การสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตในไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียสามารถสร้างและสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตไว้ในเม็ดแกรนูลภายในเซลล์ ซึ่งการสะสมสารประกอบดังกล่าวเป็นการกักเก็บพลังงานและแหล่งคาร์บอนให้แก่เซลล์ (Markl, Grünbichler, and Lackner, 2018) โดยพบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการจำกัดธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ทำให้มีการสะสมของสารพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเพิ่มมากขึ้น ซึ่งคาดว่า NADPH อาจเป็นองค์ประกอบที่ช่วยทำให้เกิดการสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต เนื่องจากเซลล์เมื่ออยู่ในสภาวะการขาดไนโตรเจนจะไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนได้ จึงทำให้มีการใช้ NADPH ลดลง และมี NADPH ปริมาณมากภายในเซลล์ จึงอาจกระตุ้นการสร้างพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้ (Lee et al., 2001) ซึ่งบทบาทอื่น ๆ นอกจากการเป็นสารประกอบกักเก็บภายในเซลล์ ยังคงมีข้อมูลไม่ชัดเจน มีการคาดว่าเป็นการส่งเสริมการกักเก็บอิเล็กตรอน ช่วยสร้าง NADP^+ และอาจช่วยการต้านทานภาวะเครียดของเซลล์ (Troschl et al., 2018) อย่างไรก็ตามไม่ใช่ไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิดที่สามารถผลิตและสะสมสารพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้ โดยชนิดที่พบสามารถสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้ เช่น *Athrospira maxima* *Oscillatoria jatorvensis*, *Synechocystis* PCC6803 *Nostoc muscorum* *Nostoc punctiforme* *Anabaena* sp. และ *Calothrix brevisseima* (Ansari and Fatma, 2016; Price et al., 2020)

2.4.3. สมบัติของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต เป็นพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ และสามารถละลายได้ในสารละลายคลอโรฟอร์ม มีสมบัติใกล้เคียงกับพอลิโพรไพลีน (polypropylene: PP) ซึ่งเป็นพลาสติกจากปิโตรเลียมที่ใช้งานทางด้านอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย โดยพอลิเมอร์ทั้งสองมีโครงสร้างโมเลกุลขนาดของมอนอเมอร์ที่มีหมู่แทนที่เป็นหมู่เมทิล และสมบัติทางกายภาพบางประการที่คล้ายคลึงกัน (ตารางที่ 2.1) เช่น ค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature, T_m) ค่าความเป็นผลึก (crystallinity) และค่าความคงทนต่อแรงดึง (tensile strength) แต่ข้อแตกต่างระหว่างพอลิเมอร์ทั้งสองคือ การย่อยสลายตามธรรมชาติ เนื่องจากหน่วยย่อยของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเชื่อมกันด้วยพันธะเอสเทอร์ แต่พอลิโพรไพลีนรวมถึงพลาสติกจากปิโตรเลียมอื่น ๆ เชื่อมกันด้วยพันธะคาร์บอนกับคาร์บอน ซึ่งจุลินทรีย์จากธรรมชาติไม่สามารถย่อยพันธะดังกล่าวได้ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเป็นพลาสติกที่สามารถถูกย่อยสลายตามธรรมชาติได้ แต่พลาสติกจากปิโตรเลียมไม่สามารถถูกย่อยสลายในธรรมชาติได้ นอกจากนี้พบว่าพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตมีความเปราะสูง เนื่องจากมีค่าการยืดตัว ณ จุดขาด (extension to break) ต่ำ อย่างไรก็ตาม พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต ก็ยังได้รับความสนใจสูงในการเป็นตัวแทนของพอลิโพรไพลีน เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ด้านต่าง ๆ เช่น ด้านการแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรม (Price et al., 2020)

ตารางที่ 2.1. เปรียบเทียบคุณสมบัติทางกายภาพระหว่างพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตและพอลิโพรไพลีน (Price et al., 2020)

คุณสมบัติ	PHB	PP
อุณหภูมิหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	177	176
อุณหภูมิสภาพแก้ว (องศาเซลเซียส)	2	-10
อุณหภูมิเริ่มต้นการย่อยสลาย (องศาเซลเซียส)	220	357
ค่าความเป็นผลึก (%)	60	50-70
ความทนต่อแรงดึง (MPa)	43	38
การยืดตัว ณ จุดขาด (%)	5	400

2.5. พลาสติกชีวภาพ (bioplastic)

พลาสติกชีวภาพ หมายถึง พลาสติกที่ทำมาจากวัสดุทางชีวภาพ หรือพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ กล่าวคือเป็นพลาสติกที่ถูกสร้างขึ้นจากพอลิเมอร์ชีวภาพที่สังเคราะห์มาจากวัตถุดิบธรรมชาติที่เป็นทรัพยากรหมุนเวียน เช่น แป้ง (starch) เซลลูโลส (cellulose) โปรตีน (proteins) ลิกนิน (lignin) ไคโตซาน (chitosan) พอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid: PLA) และพอลิไฮดรอกซีอัลคานอเอท (polyhydroxyalkanoates: PHAs) เป็นต้น หรือเป็นพลาสติกที่สร้างจากพอลิเมอร์ที่ไม่ได้สังเคราะห์มาจากวัตถุดิบธรรมชาติแต่เป็นพอลิเมอร์ปิโตรเลียมจากเชื้อเพลิงฟอสซิลที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ เช่น พอลิคาโพรแลคโตน (polycaprolactone: PCL) พอลิบิวทีลีนซัคซิเนต (polybutylene succinate: PBS) และพอลิบิวทีลีน อดิเพท เทอเลฟทาเลท (polybutylene adipate-co-terephthalate: PBAT) เป็นต้น (Reddy et al., 2013)

2.5.1. ฟิล์มพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide film)

ฟิล์มพอลิแซคคาไรด์ มีสมบัติในการป้องกันการแพร่ผ่านของแก๊ส คาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจนได้ดี เมื่อไม่มีการเติมพลาสติกไฮเซอร์ แต่ป้องกันไอน้ำได้ค่อนข้างต่ำ ซึ่งเป็นข้อจำกัดสำหรับการประยุกต์ใช้งานด้านบรรจุภัณฑ์อาหาร ดังนั้นควรปรับปรุงการต้านทานน้ำ และพัฒนาสมบัติการป้องกันการแพร่ผ่านแก๊สให้ดีควบคู่กัน (Mohamed, El-Sakhawy, and El-Sakhawy, 2020)

2.5.2. พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (polyhydroxybutyrate film)

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต เป็นฟิล์มที่สามารถย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วและมีสมบัติทางกายภาพใกล้เคียงกับพอลิโพรไพลีน แต่มีความแข็งและความเปราะสูงกว่า (Siracusa et al., 2008) กระบวนการแปรรูปทางความร้อนทำได้ยาก เนื่องจากอุณหภูมิการย่อยสลายค่อนข้างต่ำ และใกล้กับจุดหลอมเหลว ความสามารถในการปรับเปลี่ยนรูปต่ำ ส่วนใหญ่จึงทำการปรับปรุงสมบัติของฟิล์มด้วยการเติมพลาสติกไซเซอร์ เช่น กลีเซอรอลไตรบิวทิเรต (Glycerol tributyrate: GTB) (Quispe et al., 2021) พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol: PEG) และอะซีทิลไตรบิวทิล-ซิเทรต (acetyl tributyl citrate: ATBC) หรือใส่พอลิเมอร์ชนิดอื่น เช่น พอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid: PLA) เป็นต้น (Arrieta et al., 2014)

2.6. การตรวจสอบสมบัติของฟิล์ม

การตรวจสอบสมบัติและลักษณะทางกายภาพของฟิล์ม เพื่อศึกษาสมบัติของฟิล์มในแต่ละด้านให้มีความเหมาะสมสำหรับประยุกต์ใช้งานด้านบรรจุภัณฑ์ ทั้งการใช้งาน และความเหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ โดยสมบัติของฟิล์มที่ควรตรวจสอบ เช่น

2.6.1. สมบัติเชิงกล (mechanical property)

ทดสอบสมบัติเชิงกลตามมาตรฐานของ American society for testing and materials (ASTM) โดยการวิเคราะห์ค่าการยืดตัว ณ จุดขาด (elongation of break: ϵ_B %) โมดูลัสของสภาพยืดหยุ่น (elastic modulus: E) และความคงทนต่อแรงดึง (tensile strength: TS) (Arrieta et al., 2014)

2.6.2. ความสามารถในการละลาย (total soluble matter: TSM)

ทดสอบการละลายของฟิล์มโดยการชั่งน้ำหนักก่อนและหลังการแช่ขึ้นตัวอย่างในน้ำและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นคำนวณตามสมการ (1) (Arrieta et al., 2014)

$$TSM = \frac{m_0 - m_f}{m_0} \times 100 \quad (1)$$

หมายเหตุ m_0 = น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)

m_f = น้ำหนักหลังการทดลอง (กรัม)

2.6.3. สีและความโปร่งใสของฟิล์ม (film transparency and color)

ศึกษาสีของฟิล์มด้วยการวัดค่า Hunter color ได้แก่ ค่าความสว่าง-มืด (L) ค่าสีแดง-สีเขียว (a) และค่าสีน้ำเงิน-สีเหลือง (b) เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของแผ่นสีขาว (L=97.75 a=-0.49 และ b=1.96) จากนั้นนำมาคำนวณค่าความแตกต่างของสี (ΔE) ดังสมการ (2) ร่วมกับ

การศึกษาความโปร่งใสของฟิล์ม จากการคำนวณตามสมการ (3) (Arrieta et al., 2014; Wang and Rhim, 2015)

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad (2)$$

โดย ΔL , Δa และ Δb คือ ค่าความต่างแต่ละสีของแผ่นสีมาตรฐานกับชิ้นตัวอย่าง

$$\text{ความโปร่งใส} = \frac{A_{600}}{e} \quad (3)$$

โดย A_{600} คือ การวัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

e คือ ความหนาของฟิล์ม (มิลลิเมตร)

2.6.4. การย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradability)

ตรวจสอบการย่อยสลายตามธรรมชาติ โดยชั่งน้ำหนักเริ่มต้นของตัวอย่างและนำตัวอย่างไปฝังดินในพื้นที่เปิดตามธรรมชาติเป็นเวลา 60 วัน นำตัวอย่างที่ฝังดินมาทำความสะอาดและอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักชิ้นงานและนำมาคำนวณร้อยละการย่อยสลายตามสมการ (4) (Ansari and Fatma, 2016)

$$\text{ร้อยละการย่อยสลาย (\%)} = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100 \quad (4)$$

โดย W_0 คือ น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)

W_t คือ น้ำหนักวันที่ทำการเก็บข้อมูล (กรัม)

2.7. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาการผลิตพอลิแซคคาไรด์ของ Tiwari และคณะ (2019) พบว่า *Anabaena* sp. CCC 745 สามารถผลิตคาร์โบไฮเดรตในปริมาณเฉลี่ยร้อยละ 30 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยสามารถผลิตพอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์และพอลิแซคคาไรด์ภายนอกเซลล์เท่ากับ 174.5 และ 145.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ในอาหารเหลวบีจี-11 (BG-11) ที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และช่วงเวลาการให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ซึ่งพบว่าพอลิแซคคาไรด์ที่ได้เป็นเฮเทอโรพอลิแซคคาไรด์ประกอบด้วยกลูโคส ไฮโลส แรมโนส และกรดกลูคูโรนิก

การศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตของ Ansari และ Fatma (2016) พบว่า *Anabaena variabilis* และ *Anabaena* sp. NCCU-9 สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้

ร้อยละ 1.94 และ 1.87 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยง 21 วัน ในอาหารเหลว บีจี-11 ที่ปราศจากโซเดียมไนเตรท (BG-11₀) ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ± 1 องศาเซลเซียส และช่วงเวลาการให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน

การศึกษาการขึ้นรูปและตรวจสอบสมบัติของฟิล์มจากพอลิแซคคาไรด์ของ Rodriguez Torres และ López (2017) ที่สกัดจาก *Nostoc muscorum* โดยใช้ความเข้มข้น 1% โดยมวลต่อปริมาตร และกลีเซอรอลความเข้มข้น 0.3% โดยมวลต่อปริมาตร พบว่าฟิล์มมีลักษณะของโมเลกุลพอลิเมอร์จัดเรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบ (amorphous) อุณหภูมิเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วที่ -25 องศาเซลเซียส และสมบัติเชิงกลใกล้เคียงกับฟิล์มจากพอลิแซคคาไรด์จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

การศึกษาการขึ้นรูปและตรวจสอบสมบัติของฟิล์มจากพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตของ Ansari และ Fatma (2016) ที่สกัดจาก *Nostoc muscorum* โดยใช้ความเข้มข้น 15% โดยมวลต่อปริมาตร ละลายในสารละลายคลอโรฟอร์มและขึ้นรูปด้วยเทคนิคการหล่อฟิล์มจากสารละลาย พบว่าฟิล์มมีลักษณะโปร่งใส สมบัติการทนต่อความร้อนและสมบัติเชิงกลใกล้เคียงกับพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตมาตรฐาน และสามารถย่อยสลายได้เร็วกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับพลาสติกจากปิโตรเคมี

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการศึกษา

3.1. สารเคมี

- โซเดียมไนเตรท (Sodium nitrate) (Kemaus, Australia)
- โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium di-hydrogen phosphate: KH_2PO_4) (Kemaus, Australia)
- โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) (Ajax Finechem, Australia)
- แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride) (Kemaus, Australia)
- ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (Di-potassium hydrogen orthophosphate: K_2HPO_4) (Ajax Finechem, Australia)
- แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulphate) (Ajax Finechem, Australia)
- ซิงค์ซัลเฟต (Zinc sulphate 7-hydrate) (Kemaus, Australia)
- แมงกานีส (II) คลอไรด์ (Manganese (II) chloride) (Kemaus, Australia)
- โมลิบดีนัมออกไซด์ (Molybdenum trioxide) (Kemaus, Australia)
- คอปเปอร์ (II) ซัลเฟต (Copper (II) sulphate 5-hydrate) (Kemaus, Australia)
- กรดบอริก (Boric acid) (Kemaus, Australia)
- อี.ดี.ที.อี. ได-โซเดียมซอลท์ (EDTA di-sodium salt) (Kemaus, Australia)
- โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide) (Kemaus, Australia)
- ไอรอน (II) ซัลเฟต (Iron (II) sulphate 7-hydrate) (Kemaus, Australia)
- กรดซิตริก (Citric acid) (Ajax Finechem, Australia)
- โคบอลท์ (III) ไนเตรต (Cobalt (III) nitrate 6-hydrate) (Kemaus, Australia)
- โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) (Merck/ Germany)
- เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรต (Ferric ammonium citrate) (Himedia Laboratories Pvt. Ltd, India)
- โซเดียมโมลิบเดต (Sodium molybdate: $\text{Na}_3\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Ajax Finechem, Australia)
- กรดซัลฟิวริก (Sulphuric acid) (Ajax Finechem, Australia)
- เอทานอล 95% (องค์การสุรากรมสรรพสามิต, ประเทศไทย)
- คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (Carboxymethyl cellulose: CMC) (Sigma-Aldrich, USA)
- พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Poly [(R)-3-hydroxybutyric acid]) (Sigma-Aldrich, Germany)
- อะซิโตน (Acetone) (Merck/ Germany)
- ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) (Merck/ Germany)
- กลีเซอรอล (Glycerol) (Ajax Finechem, Australia)

- คลอโรฟอร์ม (Chloroform) (RCI Labscan, Thailand)
- เมทานอล (Methanol) (RCI Labscan, Thailand)
- ไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl ether) (QReC, New Zealand)

3.2. วัสดุ อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเชิงประกอบ (Nikon eclipse E100, Nikon Corporation, Japan)
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR machine) (PTC-100™ programmable Thermal Controller, Bio-Rad Laboratories, USA)
- เครื่องรันเจลเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis system) (Genius, SKbio, Japan)
- เครื่องเขย่า (shaker) (SPL15, Labcon, The Republic of South Africa)
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (BL610, Sartorius, Germany)
- เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง (TC-205, Denver Instrument, Company, USA)
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter) (Mettler Toledo, 1120)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Rotofix32, Hettich, Germany)
- ตู้อบ (hot air oven) (Mettler, Germany)
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Ta Chang Medical Instrument Factory, Taiwan)
- ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow (PP-50, ISSOC, Thailand)
- เครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) (Nicolet 6700, Thermo Scientific)
- เครื่องกวนสารแบบใช้แม่เหล็ก (magnetic stierer) (Plas Al, Ta Chang Medical Instrument, Factory/Taiwan)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (16M, Labnet International, Inc.,USA)
- เครื่องปั๊มลมออกซิเจน (mega 8000, TWIN)
- เครื่องกวนสารละลายพร้อมเตาให้ความร้อน (Hot plate and Magnetic Stirrer) (C-MAG HS10, IKA/ Germany)

3.3. วิธีการดำเนินการศึกษา

3.3.1. ไชยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

Anabaena sp. ได้รับความอนุเคราะห์จากคลังเชื้อของหน่วยปฏิบัติการวิจัย การใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.2. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Anabaena* sp.

ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Anabaena* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเชิงประกอบเปรียบเทียบกับข้อมูลอ้างอิงของ Prescott (1954)

3.3.3. การระบุชนิด *Anabaena* sp. ด้วยข้อมูลทางพันธุกรรมและวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

3.3.3.1. การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

นำเซลล์ *Anabaena* sp. ที่เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่มาทำการสกัดดีเอ็นเอในหลอดไมโครเซ็นติฟิวส์ ขั้นตอนแรกเติมสารละลายบัฟเฟอร์ดีเอ็นเอ 750 ไมโครลิตรเพื่อทำการแตกเซลล์ และย่อยอาร์เอ็นเอด้วยอาร์เอ็นเอส 10 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล 500 ไมโครลิตรแล้วทำการปั่นเหวี่ยงสาร นำส่วนของเหลวมาเติมด้วยสารละลายคลอโรฟอร์มอัตราส่วน 1 ต่อ 1 แล้วทำการปั่นเหวี่ยงสาร เก็บส่วนของเหลวมาเติมด้วยสารละลายไอโซโพรพานอล 600 ไมโครลิตร และทำการปั่นเหวี่ยงสารอีกครั้ง นำส่วนตะกอนที่ได้เติมด้วย 70% เอทานอล 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงสารเป็นครั้งสุดท้ายและทิ้งไว้ให้แห้ง จะได้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ จากนั้นตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยผสมดีเอ็นเอกับ loading dye และทำการรันเจลในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.8% โดยมวลต่อปริมาตร ใน TBE buffer ร่วมกับ ViSafe Red เพื่อให้ทราบตำแหน่งของดีเอ็นเอภายหลังการรันเจล โดยมี 1 kb เป็นขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Ladder) (Sambrook, Fritsch, and Maniatis, 1989)

3.3.3.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเครื่องหมายยีน 16S ribosomal RNA

นำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16S ribosomal RNA (16S rDNA) โดยผสมเป็น Master Mix ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer) นิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (deoxynucleotide triphosphates: dNTPs) น้ำกลั่นบริสุทธิ์ (deionized water) เอนไซม์ที่ทำให้เกิดการต่อสายของนิวคลีโอไทด์ (FX Neo) และไพรเมอร์ (primer) ได้แก่ forward primer: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ reverse primer: 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGAC-3') ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (polymerase chain reaction; PCR) เริ่มจากขั้นตอนแรก initial denaturation ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และเข้าสู่รอบเพิ่มปริมาณจำนวน 35 รอบ ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที ขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 30 วินาที และขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นตรวจสอบขนาดผลผลิตของการทำ PCR (amplicon) ที่ได้ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เช่นเดียวกับการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอ และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยหลักการของแซงเกอร์ (Sanger sequencing method) (ดัดแปลงจาก Makra et al, 2019)

3.3.3.3. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละไพรเมอร์มาเปรียบเทียบกับความคล้ายของดีเอ็นเอ เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA จากนั้นนำ มา BLASTn กับฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ (non-redundant nucleotide database) ใน GenBank เพื่อเปรียบเทียบความใกล้เคียงกับไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่นๆ และนำผลข้อมูลที่ได้จาก GenBank มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการ โดยการเปรียบเทียบความคล้ายของดีเอ็นเอ (multiple alignment) ด้วยโปรแกรม MAFFT on XSEDE (7.471) (Kato and Standley, 2013) และทำการเปลี่ยนรูปแบบไฟล์ เพื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการ ด้วยโปรแกรม NCLconverter (2.1) (Lewis and Holder, 2008) และหา model สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการ ด้วยโปรแกรม JModelTest2 on XSEDE (2.1.6) (Posada, 2008) จากนั้นสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการเครื่องหมายยีน 16S rDNA ด้วยวิธี Maximum likelihood โดยใช้โปรแกรม RAxML-HPC BlackBox (8.2.12) (Stamatakis, 2014) และวิธี Bayesian inference ด้วยโปรแกรม MrBayes on XSEDE (3.2.7a) (Ronquist and Huelsenbeck, 2013) บน CIPRES (Miller, Pfeiffer, and Schwartz, 2010)

3.3.4. การศึกษาผลของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโต

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่ดัดแปลงมาจาก Ansari และ Fatma (2016) Sharma และ Mallick (2005) และ Tiwari และคณะ (2019) โดยแบ่งการเพาะเลี้ยงเป็น 2 ขั้นตอน ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ และการเพาะเลี้ยงเพื่อเก็บเกี่ยวเซลล์

3.3.4.1. การเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในอาหารเหลวของโบลด์ (Bold's basal medium: BBM) (Kantz and Bold, 1969) และ บี จี -11 (BG-11) (Rippka et al., 1979) (ภาคผนวก ก) โดยกำหนดเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้น 3% โดยปริมาตร ของอาหารเพาะเลี้ยงปริมาตรสุทธิ 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 2 องศาเซลเซียส) การเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที และให้ความเข้มข้นแสงสม่ำเสมอต่อเนื่อง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 10 วัน จากนั้นนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีปริมาตรมากขึ้นเพื่อเก็บเกี่ยวเซลล์

3.3.4.2. การเพาะเลี้ยงเพื่อเก็บเกี่ยวเซลล์

นำไซยาโนแบคทีเรียจากข้อ 3.3.4.1. มาเพาะเลี้ยงในขวดโหลปริมาตร 10 ลิตร โดยนำไซยาโนแบคทีเรียจากขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว BBM ลงเพาะเลี้ยงในขวดโหลที่มีอาหารเหลว BBM และนำไซยาโนแบคทีเรียจากขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว BG-11 ลงเพาะเลี้ยงในขวดโหลที่มีอาหารเหลว BG-11 ที่ปราศจากโซเดียมไนเตรท (BG-11₀) (Rippka et al., 1979) (ภาคผนวก ก) โดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์ 10% โดยปริมาตร ในขวดโหลที่มีอาหารเพาะเลี้ยงปริมาตรสุทธิ 5 ลิตร ภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 2 องศาเซลเซียส) ความเข้มข้นแสง

สม่ำเสมอต่อเนื่อง 16 ชั่วโมงต่อวัน และให้ออกซิเจนตลอดเวลา โดยวัดการเจริญเติบโตด้วยการเก็บ น้ำหนักเซลล์แห้งทุก ๆ 3 วัน และเก็บเกี่ยวเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 21 วัน โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นำเซลล์มาอบที่ 60 องศาเซลเซียสจนมีน้ำหนักคงที่และบันทึก น้ำหนักเซลล์แห้ง โดยทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

3.3.5. การศึกษาผลของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการผลิตพอลิแซคคาไรด์และพอลิไฮดรอกซี-บิวทิเรต

3.3.5.1. การสกัดสารพอลิแซคคาไรด์ภายนอกเซลล์

นำส่วนอาหารเหลว BBM และ BG-11₀ ที่ได้จากการเก็บเกี่ยวเซลล์ 21 วัน จากข้อ 3.3.4.2 มาไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อระเหยน้ำออก และตกตะกอน พอลิแซคคาไรด์ภายนอกเซลล์ด้วยเอทานอลอัตราส่วน 1 ต่อ 2 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวตะกอนของพอลิแซคคาไรด์ภายนอกเซลล์ (extracellular polysaccharide: EPS) จากการกรองผ่านกระดาษกรองและนำมาอบที่ 60 องศาเซลเซียสจนมี น้ำหนักคงที่และบันทึกน้ำหนักของพอลิแซคคาไรด์ภายนอกเซลล์ (Tiwari et al., 2019) โดยทำการ ทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

3.3.5.2. การสกัดพอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์

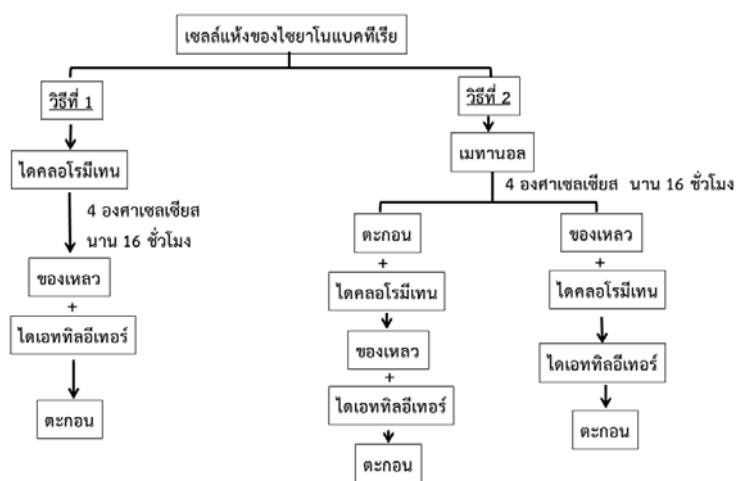
นำเซลล์แห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BBM และ BG-11₀ เป็นเวลา 21 วัน จากข้อ 3.3.4.2 มาแตกเซลล์ในน้ำกลั่นอัตราส่วน 1 ต่อ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นทำ การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที และกรองเพื่อคัดแยกน้ำส่วนของเหลวมาตกตะกอนด้วย เอทานอลในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง เก็บเกี่ยว ตะกอนของพอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์ (intracellular polysaccharide: IPS) จากการกรองผ่าน กระดาษกรอง นำตะกอนมาอบที่ 60 องศาเซลเซียสจนมีน้ำหนักคงที่และบันทึกน้ำหนักของ พอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์ (Tiwari et al., 2019) โดยทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

3.3.5.3. การสกัดสารพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจาก *Anabaena* sp.

นำเซลล์แห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BBM และ BG-11₀ เป็นเวลา 21 วัน จากข้อ 3.3.4.2 มาสกัดสารพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Ansari และ Fatma (2016) Johnsson และ Steuer (2018) และ Sharma และ Mallick (2005) โดยทำการ ทดลองทั้งหมด 2 วิธี (รูปที่ 3.1) ได้แก่

วิธีที่ 1 แตกเซลล์ในสารละลายไดคลอโรมีเทน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนของเหลวที่ได้จากการกรองมาเติมสารละลาย ไดเอทิลอีเทอร์เพื่อตกตะกอนพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต เก็บเกี่ยวตะกอนโดยการกรองผ่านกระดาษ กรอง ล้างตะกอนที่ได้ด้วยอะซิโตนอย่างน้อย 3 ครั้ง นำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียสจนมีน้ำหนักคงที่ และบันทึกน้ำหนักของสารที่สกัดได้โดยทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

วิธีที่ 2 แยกเซลล์ในสารละลายเมทานอลบริสุทธิ์ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงและแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนของตะกอน นำกลับมาแยกเซลล์อีกครั้งในสารละลายไดคลอโรมีเทน คัดแยกนำส่วนของเหลวที่ได้จากการกรองมาเติมสารละลายไดเอทิลอีเทอร์เพื่อตกตะกอนพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต และส่วนของเหลวนำมาเติมสารละลายไดคลอโรมีเทนและสารละลายไดเอทิลอีเทอร์เพื่อตกตะกอนพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต เก็บเกี่ยวตะกอนโดยการกรองผ่านกระดาษกรอง ล้างตะกอนที่ได้ด้วยอะซิโตนอย่างน้อย 3 ครั้ง นำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียสจนมีน้ำหนักคงที่และบันทึกน้ำหนักของสารที่สกัดได้โดยทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ



รูปที่ 3.1. วิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

3.3.6. การวิเคราะห์โครงสร้างของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

นำพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดได้และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตทางการค้ามาวิเคราะห์โครงสร้างเบื้องต้นด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (Fourier transform Infrared: FTIR) (Ansari and Fatma, 2016)

3.3.7. การขึ้นรูปและตรวจสอบสมบัติของฟิล์ม

3.3.7.1. การขึ้นรูปฟิล์ม

ขึ้นรูปฟิล์มด้วยเทคนิคการหล่อฟิล์มจากสารละลาย (solvent casting technique) ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Bhati และ Mallick (2015)

3.3.7.1.1. การขึ้นรูปฟิล์มพอลิแซคคาไรด์

นำพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้มาละลายในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นำส่วนของสารละลายพอลิแซคคาไรด์ ความเข้มข้น 0.35% โดยมวลต่อปริมาตร มาผสมกับสารละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose: CMC) ความเข้มข้น 1.5% โดยมวลต่อ

ปริมาณ ที่ได้จากการละลายในน้ำกลั่นด้วยวิธีเดียวกัน โดยมีกลีเซอรอล ความเข้มข้น 0.1% โดยปริมาตร เป็นพลาสติกไซเซอร์ (plasticizers) จากนั้นทำการผสมส่วนประกอบทั้ง 3 ให้เข้ากันและเทลงเพลตแม่พิมพ์ 10 × 10 ตารางเซนติเมตร บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 วัน นำฟิล์มออกจากแม่พิมพ์และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องในสภาวะความชื้นต่ำที่ร้อยละ 30 จนกว่าทำการทดสอบสมบัติของฟิล์ม (ดัดแปลงจาก Rodriguez, Torres, and López, 2017)

3.3.7.1.2. การขึ้นรูปฟิล์มพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

ทำการขึ้นรูปฟิล์มพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต ความเข้มข้น 1% โดยมวลต่อปริมาตร จากการนำพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดได้ มาละลายในคลอโรฟอร์ม ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และนำของเหลวที่ได้จากการกรอง มาผสมกับสารละลายพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตทางการค้า ที่ผ่านการละลายในคลอโรฟอร์มและการกรองด้วยวิธีเดียวกัน โดยมีอัตราส่วนพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดได้ 1 ส่วนต่อพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต 7 ส่วน และมีกลีเซอรอลความเข้มข้น 0.1% โดยปริมาตร เป็นพลาสติกไซเซอร์ จากนั้นทำการผสมส่วนประกอบทั้ง 3 ให้เข้ากันบนเครื่องกวนสารละลายพร้อมเตาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเทลงในเพลตแม่พิมพ์ที่เป็นแก้วเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้องจนมีการขึ้นรูปฟิล์ม ลอกฟิล์มออกจากแม่พิมพ์และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องในสภาวะความชื้นต่ำที่ร้อยละ 30 จนกว่าทำการทดสอบสมบัติของฟิล์ม (ดัดแปลงจาก Bhati and Mallick, 2015)

3.3.7.2. ตรวจสอบสมบัติทางกายภาพฟิล์ม

นำฟิล์มพอลิแซคคาไรด์ และฟิล์มพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต มาตรวจสอบสมบัติการส่องผ่านของแสงเบื้องต้น โดยสังเกตความชัดของตัวอักษร (ก) ที่อยู่ด้านหลังของฟิล์ม ดัดแปลงจาก Anbukarasu, Sauvageau, และ Elias (2015)

3.3.8. การวิเคราะห์ทางสถิติ

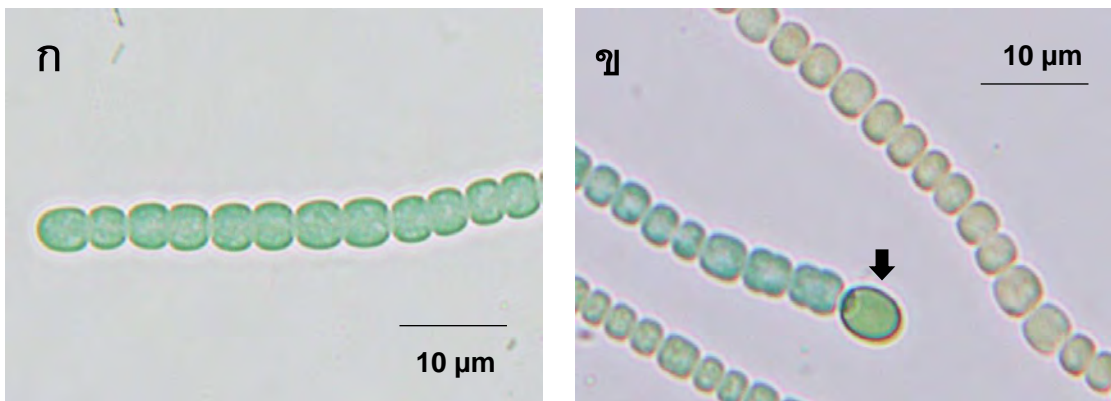
วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติจากผลการทดลองที่ได้ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics เวอร์ชัน 22 (IBM, USA) โดยการใช้ Student t-test เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณพอลิแซคคาไรด์ และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่แตกต่างกัน 2 สูตรอาหาร ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ $p \leq 0.05$

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Anabaena* sp.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Anabaena* sp. เมื่อทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเชิงประกอบ พบว่าเซลล์มีรูปร่างคล้ายทรงกระบอกเรียงต่อกันจนเกิดรูปร่างแบบเส้นสายเพียงหนึ่งเส้น (uniseriate filament) ซึ่งมีลักษณะตรงไม่มีวงงอ ไม่มีการแตกแขนง เซลล์ทุกเซลล์ภายในเส้นสายมีขนาดสม่ำเสมอและมีสีเขียวแกมน้ำเงินที่ชัดเจน ไม่พบเมือกหุ้ม (sheath) ครอบคลุมตลอดทั้งเส้นสาย โดยเซลล์มีขนาดด้านกว้างและด้านยาวประมาณ 4.13 ± 0.25 และ 3.49 ± 0.25 ไมโครเมตร ตามลำดับ ซึ่งพบลักษณะเช่นนี้ในอาหารเหลว BBM (รูปที่ 4.1ก) แต่เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในอาหารเหลว BG-11₀ ที่ปราศจากโซเดียมไนเตรท พบว่าเซลล์มีสีเขียวและมีความยาวไม่สม่ำเสมอเกิด heterocyte รูปร่างคล้ายไข่ที่ตำแหน่งปลายของเส้นสาย มีขนาดด้านกว้างและด้านยาวประมาณ 4.43 ± 0.45 และ 5.12 ± 0.50 ไมโครเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.1ข)



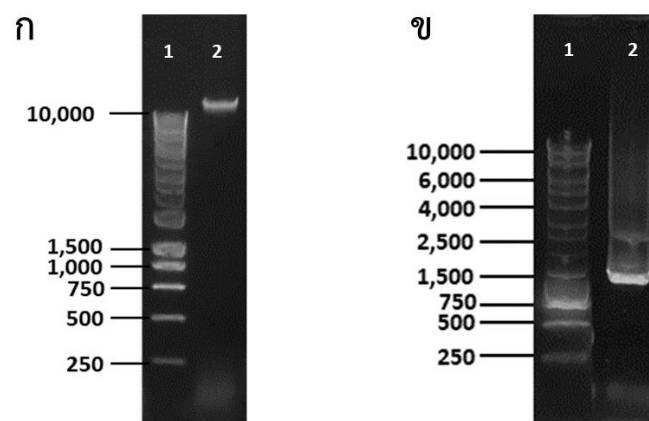
รูปที่ 4.1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Anabaena* sp. (ก) vegetative cell ในอาหารเหลว BBM (ข) heterocyte (ลูกศรชี้) ในอาหารเหลว BG-11₀

4.2. การระบุชนิด *Anabaena* sp. ด้วยข้อมูลทางพันธุกรรมและวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการ

จากการสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า 10,000 คู่เบส (รูปที่ 4.2ก) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนเครื่องหมายยีน 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสึส แล้วทำการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนของยีน 16S rDNA (amplicons) มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 1,500 คู่เบส (รูปที่ 4.2ข)

จึงนำผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนเครื่องหมายยีน 16S rDNA ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาคผนวก ข) และทำการเปรียบเทียบความคล้ายของดีเอ็นเอ (alignment) ในแต่ละสายของไพรเมอร์ พบว่ามีความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,401 คู่เบส ดังนี้

```
5'-GGCCGTACGCTTCTTACCATGCAGTCGAACGGAATCCTTAGGGATTTAGTGCCGGACGGGTGAG
TAACGCGTGAGAATCTGCCTTCAGGTTCTGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGGATGTGCCGAGAG
GTGAAAGGCTTGCTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGTGTAAAGGGACTACCAAGGCG
ACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACTGGAGA
GGCAGCAGCTGGGGTAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCT
CTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTTAGGGAATAATTCAATGAAGGTACCTAAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTG
GTTTGTCAAGTCTGCTGTCAAAGAATGAGGCTTAACCTCATCAAGGCAGTGAAACTGAGAGACTAGAGTGCG
TTCGGGGCAGAAGGAATTCCTGGTGTACCGGTGAAATGCGTAGAGATCAAGAAGAACACCGGTGGCGAAAGC
GTTCTGCTAGGCCCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAAGGGAGCGAATGGGATTATATACCCAGCAGTC
CTAGCCGTAACGATGGATACTAGGCGTTGTCTGTATCGACCCGGACAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTAT
CCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGTA
TGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGTGCGGAATCTTGATGAAAGTCGAG
AGTGCCTTCGGGAGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGT
CCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACA
AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCCTGGGCTACACACGTACTACAATGC
TACGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCAAATCCCGGAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGCAGGCT
GCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAAGTCAAGTACTGCAAGTGAATTGTTCCCGGGC
CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCCGAAGTCATACCCCAACCGTAAGGAGGGGGGA
TGCTAAGGTATAGACCTGTACCTGC-3'
```

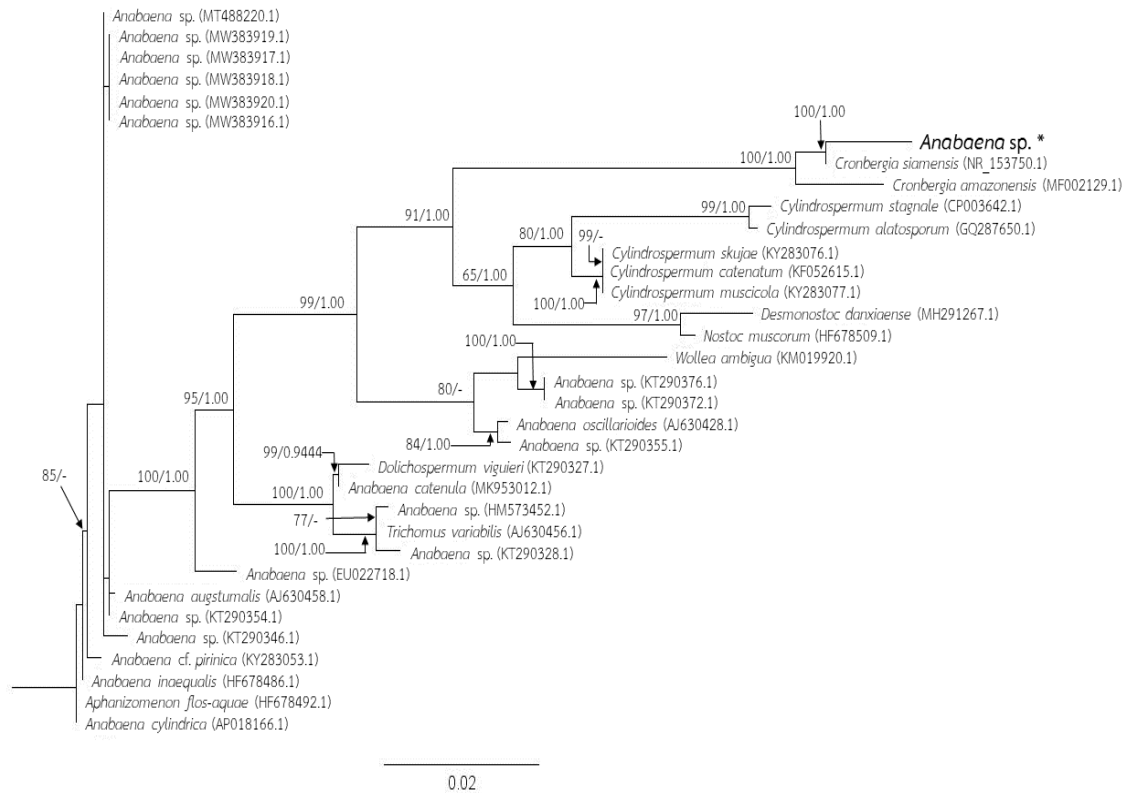


รูปที่ 4.2. การตรวจสอบขนาดความยาวดีเอ็นเอของ *Anabaena* sp. ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ก) ขนาดความยาวดีเอ็นเอจากการสกัดเซลล์ *Anabaena* sp. (ข) ขนาดความยาวดีเอ็นเอจากการเพิ่มจำนวนเครื่องหมายยีน 16S rDNA ของ *Anabaena* sp.

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายยีน 16S rDNA ที่ผ่านการเปรียบเทียบความเหมือนของดีเอ็นเอ มา BLASTn กับฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ (non-redundant nucleotide database) ใน GenBank พบว่ามีความใกล้เคียงกับชนิดอื่น ๆ ในสกุล *Anabaena* โดยมี Query coverage เท่ากับ 97-98 เปอร์เซ็นต์ และค่า Percent Identity ประมาณ 94 เปอร์เซ็นต์ โดยทั้งหมดมีค่า E value เท่ากับ 0.0 (ตารางที่ 4.1) อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถบอกชนิดของ *Anabaena* sp. ได้ จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไซยาโนแบคทีเรียสกุลต่าง ๆ ที่มีความใกล้เคียงกับ *Anabaena* sp. จากการทำ BLASTn มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ด้วยวิธี Maximum likelihood โดยมี model คือ GTR+I+G พบว่า *Anabaena* sp. ในการศึกษาครั้งนี้ มีความใกล้ชิดเชิงวิวัฒนาการกับ *Cronbergia siamensis* (NR_153750.1) ซึ่งมีชื่อดั้งเดิมว่า *Anabaena siamensis* มากที่สุด โดยมีค่า bootstrap เท่ากับ 100% และ 1.00 จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Bayesian inference (รูปที่ 4.3)

ตารางที่ 4.1. ผลการ BLASTn ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Anabaena* sp. เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รายงานในฐานข้อมูลของ GenBank

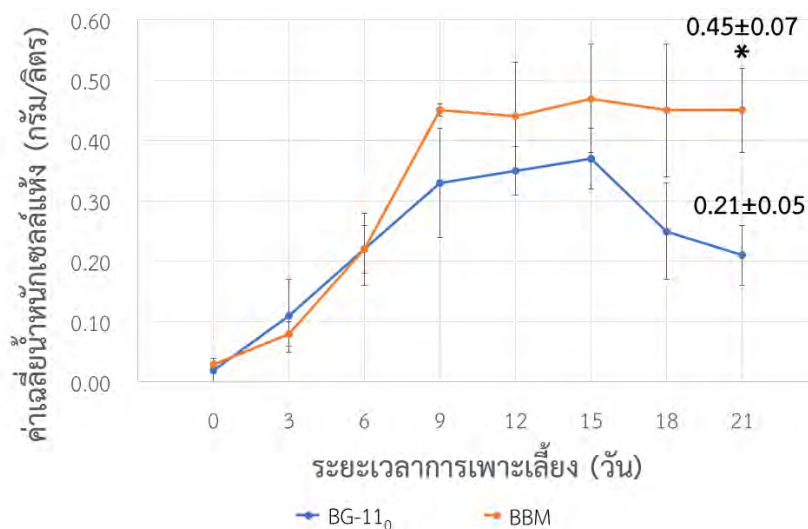
ชนิดของ <i>Anabaena</i> spp.	Query coverage	E value	Percent Identity
<i>Anabaena</i> sp. (KT290355.1)	97%	0.0	94.39%
<i>Anabaena oscillarioides</i> (AJ630428.1)	98%	0.0	94.20%
<i>Anabaena catenula</i> (MK953012.1)	98%	0.0	94.07%
<i>Anabaena cylindrica</i> (AP018166.1)	98%	0.0	94.10%
<i>Anabaena</i> sp. (EU022718.1)	98%	0.0	94.06%



รูปที่ 4.3. แผนภูมิม่วงศ์วานวิวัฒนาการของ *Anabaena* spp. ที่สร้างจากลำดับดีเอ็นเอเครื่องหมาย ยีน 16S rDNA ด้วยวิธี Maximum likelihood (GTR+I+G) โดยมีตัวเลขที่ข้อซึ่งบ่งบอกความน่าจะเป็นของค่า bootstrap จากวิธี maximum likelihood และวิธี Bayesian inference ตามลำดับ * คือ *Anabaena* sp. ที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้

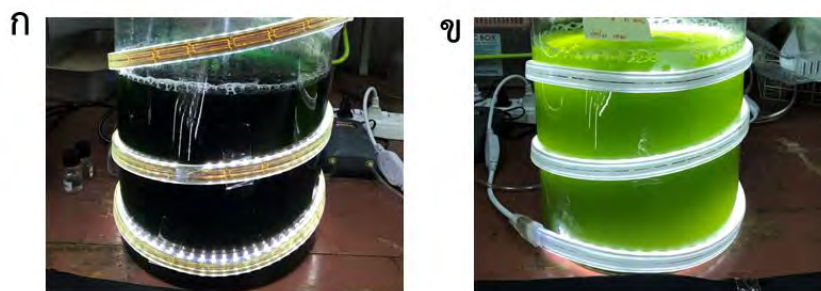
4.3. ผลของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโต

จากการเพาะเลี้ยง *Anabaena* sp. ความเข้มข้น 10% โดยปริมาตรในอาหารเหลว BBM และ BG-11₀ ปริมาตร 5 ลิตร เป็นระยะเวลา 21 วัน พบว่าค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้งจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BBM เท่ากับ 0.45 ± 0.07 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้งจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11₀ เท่ากับ 0.21 ± 0.05 กรัมต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.4) นอกจากนี้พบว่าสีที่แสดงออกมาระหว่างการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ในอาหารเหลว BBM และ BG-11₀ มีความแตกต่างกัน กล่าวคือจากการเพาะเลี้ยง *Anabaena* sp. วันแรกที่มีสีเขียวแกมน้ำเงินอ่อนในอาหารเหลวทั้ง 2 ชนิด เมื่อครบระยะเวลา 21 วัน การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BBM ให้สีเขียวแกมน้ำเงินเข้ม (รูปที่ 4.5ก) และการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11₀ ให้สีเขียวแกมเหลือง (รูปที่ 4.5ข)



รูปที่ 4.4. การเจริญเติบโตของ *Anabaena* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 21 วัน

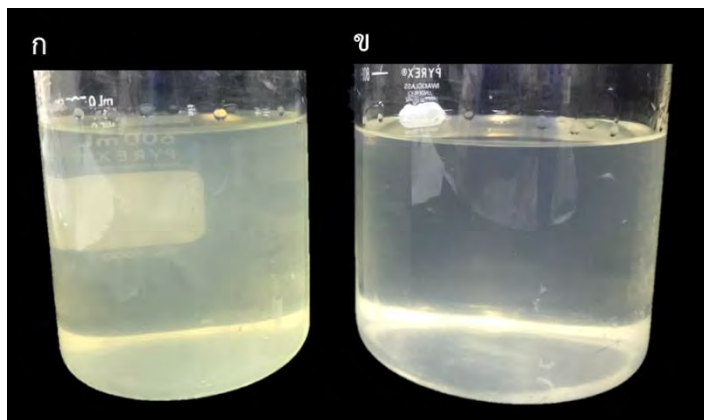
* ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) จากการวิเคราะห์ Student t-test ($n=3$)



รูปที่ 4.5. สีของ *Anabaena* sp. ในอาหารเหลวที่ต่างกัน ณ วันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง (ก) การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BBM (ข) การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11₀

4.4. ผลของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการผลิตพอลิแซคคาไรด์และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

จากการนำอาหารเหลว BBM และ BG-11₀ ที่ปราศจากเซลล์ของ *Anabaena* sp. ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน มาสกัดพอลิแซคคาไรด์ภายนอกเซลล์ พบว่าไม่ปรากฏตะกอนของพอลิแซคคาไรด์ในอาหารเหลวทั้ง 2 ชนิด โดยอาหารเหลว BBM เมื่อเติมด้วยเอทานอล ส่งผลให้สารละลายมีลักษณะเป็นของเหลวไม่มีความหนืด แตกต่างจากอาหารเหลว BG-11₀ เมื่อเติมด้วยเอทานอลส่งผลให้สารละลายมีลักษณะหนืดคล้ายเจลเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 4.6)

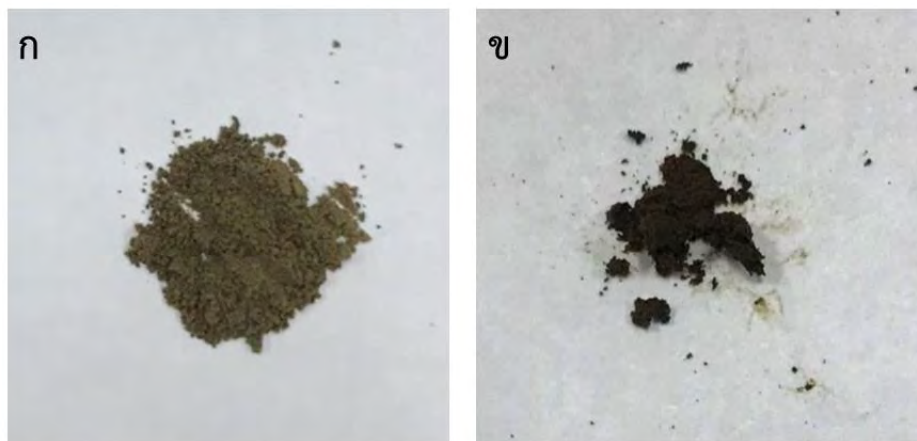


รูปที่ 4.6. ลักษณะของสารละลายจากการสกัดพอลิแซคคาไรด์ภายนอกเซลล์ (ก) อาหารเพาะเลี้ยง BBM (ข) อาหารเพาะเลี้ยง BG-11₀

จากการนำเซลล์แห้งจากการเก็บเกี่ยวเซลล์ในอาหารเหลว BBM และ BG-11₀ ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน มาสกัดพอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์ พบว่าปรากฏตะกอนของพอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์ ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาล (รูป 4.7ก) โดยเมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงปริมาณ 1 ลิตร พบว่าพอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์จากเซลล์แห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BBM มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักเท่ากับ 48.17 ± 5.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าพอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์ของเซลล์แห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11₀ ที่มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักเท่ากับ 21.0 ± 4.2 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบพอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์จากเซลล์แห้ง จากหน่วยกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง พบว่าพอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวทั้ง 2 ชนิด มีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตาราง 4.2

จากการนำเซลล์แห้งของการเก็บเกี่ยวเซลล์ในอาหารเหลว BBM และ BG-11₀ ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน มาสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต พบว่าการแตกเซลล์ในสารละลายไดคลอโรโรมีเทน และการนำส่วนของแข็งที่ได้จากการแตกเซลล์ด้วยสารละลายเมทานอลบริสุทธิ์ มาตกตะกอนพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต ไม่ปรากฏตะกอนของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต ซึ่งแตกต่างจากการนำส่วนของเหลวที่ได้จากการแตกเซลล์ด้วยสารละลายเมทานอลบริสุทธิ์ มาตกตะกอนพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต พบว่าวิธีนี้สามารถให้ตะกอนของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้ โดยมีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาล (รูปที่ 4.7ข) และเมื่อทำการเก็บข้อมูลค่าเฉลี่ยน้ำหนักของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต จากการเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงปริมาณ 1 ลิตร พบว่าพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเซลล์แห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BBM มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักเท่ากับ 26.8 ± 3.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเซลล์แห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11₀ ที่มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักเท่ากับ 14.5 ± 3.5 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากหน่วยกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง พบว่าพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจาก

เซลล์แห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวทั้ง 2 ชนิด ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตาราง 4.2



รูปที่ 4.7. สารสกัดจาก *Anabaena* sp. (ก) พอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์ (ข) พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

ตารางที่ 4.2. ค่าเฉลี่ยน้ำหนักของสารสกัดจาก *Anabaena* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ต่างกัน

อาหาร เพาะเลี้ยง	ค่าเฉลี่ยน้ำหนักของสารสกัดจาก <i>Anabaena</i> sp.				
	พอลิแซคคาไรด์ภายนอก เซลล์ (EPS) (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	พอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์ (IPS)		พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB)	
		(มิลลิกรัมต่อ กรัมเซลล์แห้ง)	(มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	(มิลลิกรัมต่อ กรัมเซลล์ แห้ง)	(มิลลิกรัม ต่อลิตร)
BBM	ND	113.33±25.17	48.17±5.8*	56.67±11.55	26.8±3.9*
BG-11 ₀	ND	100.00±20.00	21.0±4.2	70.00±0.00	14.5±3.5

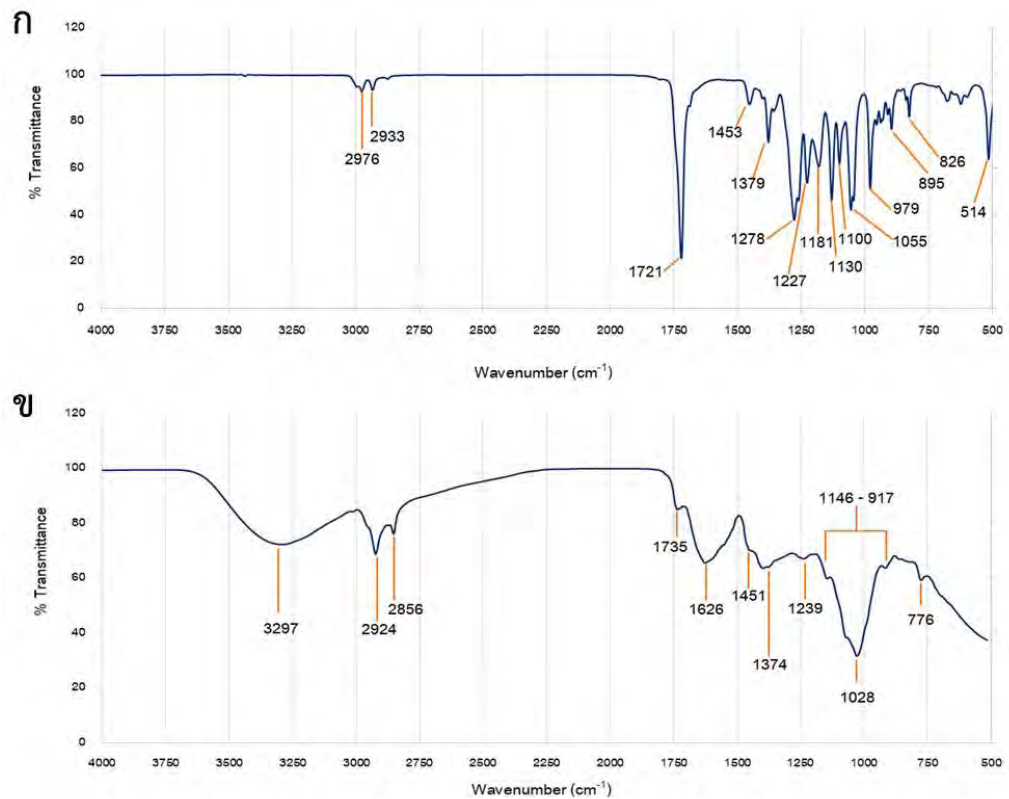
ND คือ มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจสอบได้

*ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) จากการวิเคราะห์ Student t-test ($n=3$)

4.5. การวิเคราะห์โครงสร้างของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

จากการตรวจสอบโครงสร้างเบื้องต้นของสารพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดได้จากเซลล์แห้งของ *Anabaena* sp. ด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (Fourier transform infrared spectroscopy: FTIR) พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 1735 cm^{-1} แสดงการมีหมู่คาร์บอนิล (C=O) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 1239 cm^{-1} บ่งบอกถึงการจับกันระหว่างคาร์บอนและออกซิเจนด้วยพันธะเดี่ยว (C-O-C) ค่าดูดกลืนแสงที่ $1146-917\text{ cm}^{-1}$ แสดงถึงพันธะเดี่ยวของ C-O

และ C-C ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่ 1374, 1451, 2924-2856, และ 3297 cm^{-1} แสดงหมู่แอลเคน ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}$) และหมู่ไฮดรอกซิล (O-H) ตามลำดับ (รูปที่ 4.8ข) ซึ่งสอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่แสดงหมู่ฟังก์ชันของโครงสร้างเบื้องต้นของสารพอลิไฮดรอกซี-บิวทิเรตทางการค้าจากการตรวจสอบด้วยวิธีเดียวกัน (รูปที่ 4.8ก)

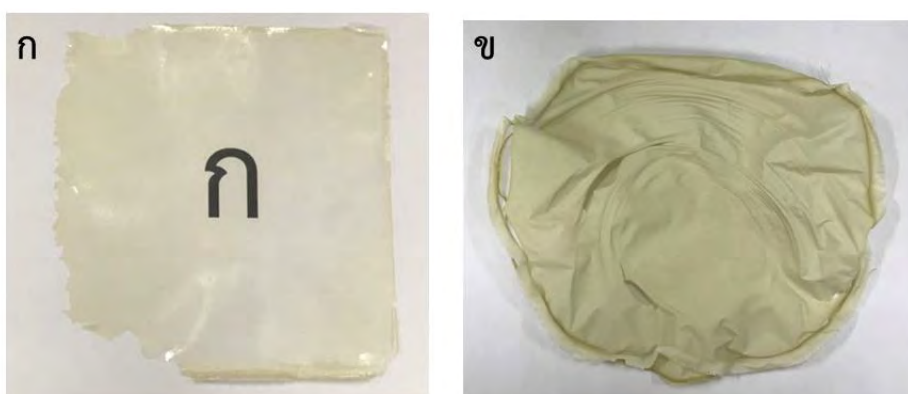


รูปที่ 4.8. โครงสร้างเบื้องต้นของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต ด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) (ก) พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตทางการค้า (ข) พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตสกัดจาก *Anabaena* sp.

4.6. การขึ้นรูปและการตรวจสอบสมบัติของฟิล์ม

การขึ้นรูปฟิล์มพอลิแซคคาไรด์ พบว่าไม่สามารถขึ้นรูปเป็นฟิล์มจากการใช้พอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์อย่างเดียวได้ จึงขึ้นรูปฟิล์มโดยการผสมพอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์ ความเข้มข้น 0.35 % โดยมวลต่อปริมาตร คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ความเข้มข้น 1.5% โดยมวลต่อปริมาตร และกลีเซอรอลความเข้มข้น 0.1% โดยปริมาตร เมื่อตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ พบว่าสามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มได้ โดยเป็นแผ่นฟิล์มสีเหลือง ลักษณะค่อนข้างเปราะ และมีความโปร่งใส เนื่องจากเห็นตัวอักษรด้านหลังแผ่นฟิล์มอย่างชัดเจน แสดงดังรูปที่ 4.9ก

การขึ้นรูปฟิล์มพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต ความเข้มข้น 1% โดยมวลต่อปริมาตร พบว่าไม่สามารถขึ้นรูปเป็นฟิล์มจากการใช้พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดจาก *Anabaena* sp. อย่างเดียวได้ จึงขึ้นรูปฟิล์มโดยการผสมระหว่างพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดได้และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตทางการค้า อัตราส่วน 1 ต่อ 7 โดยมีกลีเซอรอลความเข้มข้น 0.1% โดยปริมาตร เป็นพลาสติกไซเซอร์ เมื่อตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ พบว่าสามารถขึ้นรูปเป็นฟิล์มได้ โดยเป็นแผ่นฟิล์มสีเขียวแกมเหลือง ลักษณะค่อนข้างเปราะ และมีความทึบแสง เนื่องจากไม่เห็นตัวอักษรด้านหลังแผ่นฟิล์ม แสดงดังรูปที่ 4.9ข



รูปที่ 4.9 ฟิล์มที่มีสารสกัดจาก *Anabaena* sp. เป็นองค์ประกอบ (ก) ฟิล์มพอลิแซคคาไรด์จากการผสมพอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์ ความเข้มข้น 0.35 % โดยมวลต่อปริมาตร คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ความเข้มข้น 1.5% โดยมวลต่อปริมาตร และกลีเซอรอลความเข้มข้น 0.1% โดยปริมาตร (ข) ฟิล์มพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตความเข้มข้น 1% โดยมวลต่อปริมาตร จากการผสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดได้และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตทางการค้า อัตราส่วน 1 ต่อ 7 และกลีเซอรอลความเข้มข้น 0.1% โดยปริมาตร

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

5.1. การระบุชนิดของ *Anabaena* sp.

จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Anabaena* sp. พบว่าภายในเส้นสายมี heterocyte เซลล์มีขนาดและรูปร่างคล้ายทรงกระบอกเรียงต่อกันเป็นเส้นสายไม่มีการแตกแขนง ซึ่งตรงตามลักษณะของสกุล *Anabaena* ที่ระบุโดย Prescott (1954) นอกจากนี้พบว่าเซลล์ของ *Anabaena* sp. ในอาหารเหลว BBM และ BG-11₀ มีขนาดและสีที่แตกต่างกัน (รูปที่ 4.1) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Velázquez-Suárez Luque และ Herrero (2020) ที่รายงานว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น รูปร่างและขนาดของเซลล์ และจำนวนเซลล์ภายในเส้นสาย สามารถแปรผันตามปัจจัยการเพาะเลี้ยงได้ เช่น วัฏจักรการเจริญเติบโต ปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจน เป็นต้น

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยข้อมูลทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์เครื่องหมายยีน 16S rDNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Cronbergia siamensis* มากที่สุด ซึ่งจากการศึกษาของ Johansen และคณะ (2014) รายงานว่า *C. siamensis* Komárek, Zapomelová et Hindák (2010) เป็นชื่อพ้องโฮโมไทปิก (homotypic synonyms) ของ *Cylindrospermum siamensis* (Antarikanonda) Johansen comb. nov (2014) ซึ่งมีชื่อดั้งเดิมคือ *A. siamensis* Antarikanonda (1985) และพบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับ *Anabaena* sp. ในการศึกษาครั้งนี้ โดยเซลล์มีรูปร่างทรงกระบอกและทรงกลม มีขนาดด้านกว้าง 4-4.5 ไมโครเมตร ด้านยาว 3-5 ไมโครเมตร พบ heterocyte รูปร่างทรงกลมและทรงยาวรีที่ปลายเส้นสาย มีขนาดด้านกว้าง 3.5 ไมโครเมตร ด้านยาว 4 ไมโครเมตร

5.2. ผลของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตของ *Anabaena* sp.

จากผลการเพาะเลี้ยง *Anabaena* sp. ในอาหารเหลว BBM เป็นระยะเวลา 21 วัน พบว่ามีปริมาณเซลล์แห้งเท่ากับ 0.45 ± 0.07 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าการศึกษาของ Cordeiro และคณะ (2017) ที่ได้ปริมาณเซลล์แห้งจาก *Microcystis aeruginosa* เท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BBM เป็นเวลา 13 วัน ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง แต่มีปริมาณเซลล์น้อยกว่าการศึกษาของ Yadav และคณะ (2021) ที่ได้ปริมาณเซลล์แห้งจาก *Oscillatoria* sp. FW01 เท่ากับ 1.72 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BBM เป็นเวลา 26 วัน ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และช่วงเวลากการให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน และการศึกษาของ Khatoun และคณะ (2018) ที่ได้ปริมาณเซลล์แห้งจาก *Pseudanabaena mucicola* เท่ากับ 0.577 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BBM ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสง 24 ชั่วโมงต่อวัน

จากผลการเพาะเลี้ยง *Anabaena* sp. ในอาหารเหลว BG-11₀ เป็นระยะเวลา 21 วัน พบว่ามีปริมาณเซลล์แห้งเท่ากับ 0.21 ± 0.05 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าการศึกษาของ Ansari และ Fatma (2016) ที่ได้ปริมาณเซลล์แห้งจาก *Nostoc muscorum* NCCU-442 เท่ากับ 0.005 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11₀ เป็นเวลา 21 วัน ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ± 1 องศาเซลเซียส และช่วงเวลาการให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน แต่มีปริมาณเซลล์น้อยกว่าการศึกษาของ เทพปัญญา เจริญรัตน์ และสุเปัญญา จิตตพันธ์ (2555) ที่ได้ปริมาณเซลล์แห้งจาก *Nostoc* sp. TUBT01 1.12 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11₀ เป็นเวลา 44 วัน ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และช่วงเวลาการให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน และการศึกษาของ Rosales Loaiza และคณะ (2016) ที่ได้ปริมาณเซลล์แห้งจาก *Anabaena* sp. 1.89 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11₀ เป็นเวลา 30 วัน ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส และช่วงเวลาการให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน

จากที่กล่าวไปข้างต้นถึงแม้จะเป็นการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เหมือนกัน แต่น้ำหนักเซลล์แห้งยังคงแตกต่างกัน ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย อุณหภูมิ จำนวนวันการเพาะเลี้ยง และช่วงเวลาการให้แสง เป็นต้น

นอกจากนี้พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BBM และ BG-11₀ แตกต่างกัน โดยการเลี้ยงในอาหารเหลว BBM ทำให้ *Anabaena* sp. สามารถเจริญเติบโตได้ปริมาณเซลล์มากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11₀ ซึ่งการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11₀ ได้ปริมาณเซลล์น้อยกว่าอาจเกี่ยวข้องกับการจำกัดของธาตุอาหารไนโตรเจน เนื่องจากการจำกัดธาตุอาหารไนโตรเจน ทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า nitrogen chlorosis เป็นปรากฏการณ์ที่สารสีไฟโคไซยานินและคลอโรฟิลล์ถูกทำลาย ซึ่งส่งผลต่อการทำงานของระบบแสง I และ II ให้มีการทำงานลดลง (Troschl, Meixner, and Drosig, 2017) อย่างไรก็ตามเนื่องจากกรดอะมิโนที่ถูกปลดปล่อยจากสารสีเหล่านี้ ทำให้มีการสังเคราะห์วัตถุดิบขึ้นใหม่ จึงทำให้เซลล์ยังคงเจริญเติบโตได้ แต่ต่ำกว่า จึงทำให้มีปริมาณเซลล์น้อยกว่า และส่งผลทำให้สีของเซลล์เปลี่ยนจากสีเขียวแกมน้ำเงินกลายเป็นสีเขียวแกมเหลือง (Wu, Wu, and Shen, 2001)

5.4. ผลของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการผลิตพอลิแซคคาไรด์และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตของ *Anabaena* sp.

จากผลการสกัดพอลิแซคคาไรด์ภายนอกเซลล์ของทั้งอาหารเหลว BBM และ BG-11₀ พบว่าไม่ปรากฏพอลิแซคคาไรด์ภายนอกเซลล์ ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Tiwari และคณะ (2019) ที่ได้ปริมาณผลผลิตจาก *Anabaena* sp. CCC 745 เท่ากับ 145.72 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ในอาหารเหลว BG-11 ที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และช่วงเวลาการให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน และการศึกษาของ Parikh และ Madamwar (2006) ที่ได้ผลผลิตจาก *Oscillatoria* sp. *Nostoc* sp. และ *N. carneum* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11 เป็น

เวลา 30 วัน ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และช่วงเวลากการให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน และการศึกษาของ Singh และ Das (2011) ที่ได้ปริมาณผลผลิตจาก *A. oryzae* เท่ากับ 10 ± 0.028 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11₀ เป็นเวลา 44 วัน ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และช่วงเวลากการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ทั้งนี้การส่งและสะสมพอลิแซคคาไรด์ออกนอกเซลล์ คาดว่าเป็นกระบวนการป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อมและต้านทานต่อสภาวะเครียดที่เกิดขึ้นอาจขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย ความเค็มสูง ความเข้มแสงสูง (Phélippé et al., 2019) และการเจริญเติบโตของเซลล์ (Parikh and Madamwar, 2006) เป็นต้น

จากผลการสกัดพอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์จากเซลล์แห้งเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BBM และ BG-11₀ พบว่าปริมาณผลผลิตที่ได้ไม่มีความแตกต่างกัน เนื่องจากเซลล์ยังคงสามารถผลิตและสะสมพอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์ได้ทั้งในสภาวะที่มีธาตุอาหารและสภาวะที่มีการจำกัดธาตุอาหาร โดยพอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์ ซึ่งอาจจะเป็นไกลโคเจนจะเป็นสารประกอบกักเก็บพลังงานและคาร์บอนให้แก่เซลล์เพื่อการดำรงชีวิต (Troschl, Meixner, and Drosig, 2017) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบในด้านของการเจริญเติบโตของเซลล์ในอาหารเหลวทั้ง 2 ชนิด พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว BBM ให้ปริมาณผลผลิตที่มากกว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว BG-11₀ โดยมีปริมาณผลผลิตเท่ากับ 48.2 ± 5.8 และ 21.0 ± 4.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งน้อยกว่าการศึกษาของ Tiwari และคณะ (2019) ที่ได้ปริมาณผลผลิตจาก *Anabaena* sp. CCC 745 เท่ากับ 174.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ในอาหารเหลว BG-11 ที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และช่วงเวลากการให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน และการศึกษาของ Singh และ Das (2011) ที่ได้ปริมาณผลผลิตจาก *A. oryzae* เท่ากับ 76 ± 0.028 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11₀ เป็นเวลา 44 วัน ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และช่วงเวลากการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน จากที่กล่าวไปข้างต้นปริมาณพอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์อาจขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย ธาตุอาหาร และจำนวนวันในการเพาะเลี้ยง เป็นต้น

จากผลการสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเซลล์แห้งเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BBM และ BG-11₀ พบว่าปริมาณผลผลิตเท่ากับ 5.67% และ 7% โดยมวล ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Ansari และ Fatma (2016) ที่ได้ปริมาณผลผลิตจาก *Nostoc muscorum* NCCU-442 เท่ากับ 6.44% โดยมวล เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11₀ เป็นเวลา 21 วัน ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ± 1 องศาเซลเซียส และช่วงเวลากการให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน และมีปริมาณผลผลิตน้อยกว่าการศึกษาของ Sharma และ Mallick (2005) ที่ได้จาก *N. muscorum* เท่ากับ 8.6% โดยมวล เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11₀ เป็นเวลา 21 วัน ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส และช่วงเวลากการให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน และมีปริมาณผลผลิตมากกว่าการศึกษาของ Wu Wu และ Shen (2001) ที่ได้จาก *Synechocystis* sp. 4.1% โดยมวล เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11₀ เป็นเวลา 7 วัน ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง จากที่กล่าวไปข้างต้น

ความแตกต่างของการสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตอาจเกิดได้หลายปัจจัย เช่น ชนิดของไซยาโน-แบคทีเรีย ช่วงเวลาการให้แสง และอุณหภูมิการเพาะเลี้ยง (Ansari and Fatma, 2016) เป็นต้น

อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบในด้านของการเจริญเติบโตของเซลล์ในอาหารเหลวทั้ง 2 ชนิด พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว BBM ให้ปริมาณผลผลิตที่มากกว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว BG-11₀ แต่ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานการสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BBM ซึ่ง Panda และคณะ (2006) Sharma และ Mallick (2005) และ Wu Wu และ Shen (2001) ได้รายงานว่า การเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการจำกัดธาตุอาหารไนโตรเจน สามารถสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้มากกว่าการเลี้ยงในอาหารที่มีธาตุอาหารสมบูรณ์ จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาการสกัดพอลิแซคคาไรด์ในอาหารเหลว BBM ที่มีการจำกัดธาตุอาหารไนโตรเจน

5.5. การวิเคราะห์โครงสร้างของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดจาก *Anabaena* sp.

จากผลการวิเคราะห์โครงสร้างเบื้องต้นของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต ด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์-ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี พบว่ามีหมู่คาร์บอนิล (C=O) และการจับกันระหว่างคาร์บอนและออกซิเจนด้วยพันธะเดี่ยว (C-O-C) ซึ่งบ่งบอกได้ว่าเป็นหมู่เอสเทอร์ รวมถึงหมู่แอลเคน ได้แก่ เมทิล (-CH₃) เมทิลีน (-CH₂) และการจับกันของคาร์บอนและไฮโดเจน (-CH) ซึ่งหมู่ฟังก์ชันเหล่านี้เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างโมเลกุลของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Price et al., 2020) ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์โครงสร้างเบื้องต้นด้วยวิธีเดียวกันของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตทางการค้า และการศึกษาของ Ansari และ Fatma (2016) Gopi Balaji และ Muthvelan (2014) และ Troschl และคณะ (2018) ที่สกัดได้จาก *Nostoc muscorum* NCCU-442 *Anabaena* sp. และ *Synechocystis* sp. CICALA192 ตามลำดับ

5.6. การขึ้นรูปและการตรวจสอบสมบัติของฟิล์ม

ผลการขึ้นรูปและการตรวจสอบฟิล์มพอลิแซคคาไรด์ โดยการผสมพอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์ ความเข้มข้น 0.35 % โดยมวลต่อปริมาตร คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ความเข้มข้น 1.5% โดยมวลต่อปริมาตร และกลีเซอรอล ความเข้มข้น 0.1% โดยปริมาตร พบว่าฟิล์มมีลักษณะโปร่งใส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Johnsson และ Steuer (2018) ที่ขึ้นรูปโดยผสมพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายสีเขียว *Neochloris oleoabundans* 1.25% โดยมวลต่อปริมาตร กับคาร์บอกซีเมทิล-เซลลูโลส 0.625% โดยมวลต่อปริมาตร ที่ให้ฟิล์มลักษณะโปร่งใสเช่นเดียวกัน แต่มีการขึ้นรูปแตกต่างจากการศึกษาของ Rodriguez Torres และ López (2017) ที่สามารถขึ้นรูปเป็นฟิล์มจากการใช้พอลิแซคคาไรด์ที่สกัดจาก *Nostoc muscorum* ความเข้มข้น 1% โดยมวลต่อปริมาตร และกลีเซอรอลความเข้มข้น 0.3% โดยมวลต่อปริมาตร ซึ่งให้ฟิล์มที่มีสมบัติเชิงกลใกล้เคียงกับฟิล์มพอลิแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์

ผลการขึ้นรูปฟิล์มพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต ความเข้มข้น 1% โดยมวลต่อปริมาตร จากการผสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดได้ และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตทางการค้า อัตราส่วน 1 ต่อ 7 และ

กลีเซอรอล ความเข้มข้น 0.1% โดยปริมาตร พบว่าฟิล์มมีลักษณะทึบแสง ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Ansari และ Fatma (2016) ที่สามารถขึ้นรูปฟิล์มจากพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดจาก *N. muscorum* โดยใช้ความเข้มข้น 15% โดยมวลต่อปริมาตร ที่ให้ฟิล์มมีลักษณะโปร่งใส โดยมีสมบัติการทนต่อความร้อนและสมบัติเชิงกลใกล้เคียงกับพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตมาตรฐาน และสามารถย่อยสลายได้เร็วกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับพลาสติกจากปิโตรเคมี และการศึกษาของ Bhati และ Mallick (2015) ที่สามารถขึ้นรูปเป็นฟิล์มจากพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดจาก *N. muscorum* Agardh ความเข้มข้น 1% โดยมวลต่อปริมาตร ซึ่งฟิล์มมีลักษณะเปราะ โดยมีการยืดตัว ณ จุดขาดเท่ากับ 4.9%

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้มีพอลิแซคคาไรด์และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดได้ปริมาณจำกัด จึงไม่ได้ทำการศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มและตรวจสอบสมบัติในด้านอื่น ๆ เพิ่มเติมจากการใช้สารที่สกัดได้เพียงอย่างเดียว ทั้งนี้การขึ้นรูปและสมบัติของฟิล์มอาจเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย เช่น ความเข้มข้นของสาร ชนิดและความเข้มข้นของพลาสติกไซเซอร์ (Quispe et al., 2021) เป็นต้น

บทที่ 6

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวงค์วาน วิวัฒนาการด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายยีน 16S rDNA พบว่า *Anabaena* sp. ใน การศึกษาครั้งนี้มีความใกล้เคียงกับ *Anabaena siamensis* มากที่สุด ซึ่งสามารถเจริญเติบโตใน อาหารเหลวของโบลด์ (BBM) ได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบีจี-11 ที่ปราศจาก โซเดียมไนเตรท (BG-11₀) โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.45 ± 0.07 และ 0.21 ± 0.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 21 วัน ภายใต้สภาวะการให้แสง 16 ต่อ 8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส โดยมีการให้ออกซิเจนตลอดเวลา และไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ สามารถผลิตพอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 26.8 ± 3.9 และ 48.2 ± 5.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BBM ซึ่งมากกว่าการเพาะเลี้ยง ในอาหารเหลว BG-11₀ ที่ผลิตพอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 14.5 ± 3.5 และ 21.0 ± 4.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตามในสภาวะเดียวกันไซยาโน-แบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถส่งพอลิแซคคาไรด์ออกนอกเซลล์ได้ และเมื่อทำการขึ้นรูปฟิล์มโดยมี กลีเซอรอล ความเข้มข้น 0.1% โดยปริมาตร เป็นพลาสติกไซเซอร์ พบว่าฟิล์มพอลิแซคคาไรด์ จากการผสมพอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์ที่สกัดได้ ความเข้มข้น 0.35% โดยมวลต่อปริมาตร และ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) ความเข้มข้น 1.5% โดยมวลต่อปริมาตร มีสมบัติการส่องผ่านของ แสงอย่างดีเยี่ยม และฟิล์มพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต ความเข้มข้น 1% โดยมวลต่อปริมาตร จากการผสม พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดได้และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตทางการค้า อัตราส่วน 1 ต่อ 7 พบว่าแสง สามารถส่องผ่านได้ดี

ปัญหาและข้อเสนอแนะ

ปัญหาจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีสารพอลิแซคคาไรด์ และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดจาก *Anabaena* sp. ไม่เพียงพอสำหรับการขึ้นรูปฟิล์ม และพอลิเมอร์ที่สกัดได้ยังไม่สามารถขึ้นรูปเป็นฟิล์มได้เมื่อปราศจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ทางการค้า ดังนั้นแนวทางการผลิตฟิล์มและตรวจสอบสมบัติของฟิล์มจากไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ในอนาคต ควรศึกษาปัจจัยและสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ให้รวดเร็วและมีปริมาณมากขึ้น รวมถึงกระตุ้นการสะสมพอลิแซคคาไรด์และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต ควรศึกษาวิธีการสกัดที่ส่งผลต่อปริมาณของพอลิเมอร์เหล่านี้ให้เพิ่มมากขึ้น และควรทำให้สารบริสุทธิ์ก่อนการส่งตรวจสอบเพื่อวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลด้วยเทคนิคต่าง ๆ เพิ่มเติม เช่น เทคนิคโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance: H-NMR) เป็นต้น ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการขึ้นรูปฟิล์ม เช่น ระยะเวลาที่ใช้ในการผสมสาร ความเข้มข้นของสาร และการปรับปรุงสูตรการขึ้นรูป ไม่ว่าจะเป็นความเข้มข้นของพอลิเมอร์และพลาสติกไซเซออร์ หรือสัดส่วนการผสมกับพอลิเมอร์ชนิดอื่น ๆ เป็นต้น รวมถึงศึกษาสมบัติด้านต่าง ๆ ของฟิล์มเพิ่มเติม ได้แก่ สมบัติเชิงกล การทนต่อความร้อน การย่อยสลาย การละลาย การแพร่ผ่านของไอน้ำ และการแพร่ผ่านของแก๊ส เป็นต้น เพื่อให้ได้ฟิล์มที่มีสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้งานด้านบรรจุภัณฑ์ที่สามารถนำไปใช้งานในท้องตลาดหรือชีวิตประจำวันได้จริง

เอกสารอ้างอิง

- เทพปัญญา เจริญรัตน์ และสุเปญญา จิตตพันธ์ 2555. ผลของไนโตรเจนต่อการเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนซึ่งคัดแยกจากพื้นที่เกษตรอินทรีย์. *Thai Science and Technology Journal* 20(3): 195-201.
- Anbukarasu, P., Sauvageau, D., and Elias, A. 2015. Tuning the properties of polyhydroxybutyrate films using acetic acid via solvent casting. *Scientific reports* 5(1): 1-14.
- Ansari, S. and Fatma, T. 2016. Cyanobacterial polyhydroxybutyrate (PHB): screening, optimization and characterization. *PLoS ONE* 11(6): 1-20.
- Arrieta, M. P., Samper, M. D., López, J., and Jiménez, A. 2014. Combined effect of poly(hydroxybutyrate) and plasticizers on polylactic acid properties for film intended for food packaging. *Journal of Polymers and the Environment* 22(4): 460-470.
- Balaji, S., Gopi, K., and Muthuvelan, B. 2013. A review on production of poly- β -hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. *Algal Research* 2(3): 278-285.
- Bertocchi, C., Navarini, L., Cesàro, A., and Anastasio, M. 1990. Polysaccharides from cyanobacteria. *Carbohydrate Polymers* 12(2): 127-153.
- Bhati, R., and Mallick, N. 2015. Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production by the diazotrophic cyanobacterium *Nostoc muscorum* Agardh: process optimization and polymer characterization. *Algal Research* 7: 78-85.
- Bhatnagar, M., and Bhatnagar, A. 2019. Diversity of polysaccharides in cyanobacteria. *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications*, pp. 447-496. Springer, Singapore.
- Callieri, C., Cronberg, G., and Stockner, J. G. 2012. Freshwater picocyanobacteria: single cells, microcolonies and colonial forms. *Ecology of cyanobacteria II*, pp. 229-269. Springer, Dordrecht.
- Cordeiro, R. S., Vaz, I. C., Magalhaes, S., and Barbosa, F. A. 2017. Effects of nutritional conditions on lipid production by cyanobacteria. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 89(3): 2021-2031.

- Gopi, K., Balaji, S., and Muthuvelan, B. 2014. Isolation purification and screening of biodegradable polymer PHB producing cyanobacteria from marine and fresh water resources. *Iran. J. Energy Environ* 5: 94-100.
- Grewe C.B. and Pulz O. 2012. The biotechnology of cyanobacteria. *Ecology of Cyanobacteria II*, pp. 707-739. Springer, Dordrecht.
- Haselkorn, R. 1978. Heterocysts. *Annual Review of Plant Physiology* 29(1): 319-344.
- Kantz, T., and Bold, H. C. 1969. Phycological studies 9: morphological and taxonomic investigations of *Nostoc* and *Anabaena* in culture. *University of Texas Publication* no. 6924. University of Texas. Austin, Texas.
- Katoh, K., and Standley, D. M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772-780.
- Khatoon, H. et al. 2018. Effects of different light source and media on growth and production of phycobiliprotein from freshwater cyanobacteria. *Bioresource technology* 249: 652-658.
- Johansen, J. R. et al. 2014. Morphological and molecular characterization within 26 strains of the genus *Cylindrospermum* (Nostocaceae, Cyanobacteria), with descriptions of three new species. *Journal of Phycology* 50(1): 187-202.
- Johnsson, N. and Steuer, F. 2018. *Bioplastic material from microalgae: Extraction of starch and PHA from microalgae to create a bioplastic material*; KTH Royal Institute of Technology: Stockholm, Sweden
- Lee, S.Y., Hong, S.H., Park, S.J., Wegen, R. van., and Middelberg, A.P.J. 2001. Metabolic flux analysis of the production of poly(3-hydroxybutyrate), in: Y. Doi, A. Steinbüchel (Eds.), *Biopolymers*, vol. 3a, pp. 249-261. Wiley/VCH, Weinheim.
- Lewis, P.O. and Holder, M.T. 2008. Nexus Class Library (NCL) [online]. Available from: <http://sourceforge.net/projects/ncl> [2021, April 2].
- Makra, N. et al. 2019. Molecular taxonomic evaluation of *Anabaena* and *Nostoc* strains from the Mosonmagyaróvár Algal Culture Collection. *South African Journal of Botany* 124: 80-86.
- Markl, E., Grünbichler, H., and Lackner, M. 2018. Cyanobacteria for PHB bioplastics production: a review. In *Algae*. IntechOpen.
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., and Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees in *Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 1-8

- Mishra P. 2020. Cyanobacterial exopolysaccharide as natural sources for food packaging applications. In: Mishra P., Mishra R.R., Adetunji C.O. (eds) *Innovations in Food Technology*. pp. 171-184. Springer, Singapore.
- Mohamed, S. A., El-Sakhawy, M., and El-Sakhawy, M. A. M. 2020. Polysaccharides, protein and lipid-based natural edible films in food packaging: A review. *Carbohydrate Polymers* 238: 116178.
- Nienaber, M. A. and Steinitz-Kannan, M. 2018. *A guide to cyanobacteria: identification and impact*. Lexington, Kentucky: The University Press of Kentucky.
- Parikh, A., and Madamwar, D. 2006. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. *Bioresource Technology* 97(15): 1822-1827.
- Panda, B., Jain, P., Sharma, L., and Mallick, N. 2006. Optimization of cultural and nutritional conditions for accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Bioresource technology* 97(11): 1296-1301.
- Phélippé, M., Gonçalves, O., Thouand, G., Cogne, G., and Laroche, C. 2019. Characterization of the polysaccharides chemical diversity of the cyanobacteria *Arthrospira platensis*. *Algal Research* 38: 101426.
- Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- Prescott, G. W. 1954. *How to know the fresh-water algae*. Dubuque: W.C. Brown Co. Publishers.
- Price, S., Kuzhiumparambil, U., Pernice, M., and Ralph, P. J. 2020. Cyanobacterial polyhydroxybutyrate for sustainable bioplastic production: critical review and perspectives. *Journal of Environmental Chemical Engineering* : 104007.
- Quispe, M. M., Lopez, O. V., Boina, D. A., Stumbé, J. F., and Villar, M. A. 2021. Glycerol-based additives of poly (3-hydroxybutyrate) films. *Polymer Testing* 93: 107005.
- Reddy, M. M., Vivekanandhan, S., Misra, M., Bhatia, S. K., and Mohanty, A. K. 2013. Biobased plastics and bionanocomposites: current status and future opportunities. *Progress in polymer science*, 38(10-11): 1653-1689.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., and Stanier, R. Y. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology* 111(1): 1-61.

- Rippka, R. 1988. [2] Recognition and identification of cyanobacteria. *Methods in enzymology* 167: 28-67.
- Rodriguez, S., Torres, F. G., and López, D. 2017. Preparation and characterization of polysaccharide films from the cyanobacteria *Nostoc commune*. *Polymers from Renewable Resources* 8(4): 133-150.
- Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Rosales Loaiza, N., Vera, P., Aiello-Mazzarri, C., and Morales, E. 2016. Comparative growth and biochemical composition of four strains of *Nostoc* and *Anabaena* (Cyanobacteria, Nostocales) in relation to sodium nitrate. *Acta Biológica Colombiana* 21(2): 347-354.
- Sambrook, J., Fritsch E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sharma, L. and Mallick, N. 2005. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Nostoc muscorum*: regulation by pH, light-dark cycles, N and P status and carbon sources. *Bioresource Technology* 96(11): 1304-1310.
- Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., and Dalla Rosa, M. 2008. Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology* 19(12): 634-643.
- Singh, A. K., Sharma, L., Mallick, N., and Mala, J. 2017. Progress and challenges in producing polyhydroxyalkanoate biopolymers from cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology* 29(3): 1213-1232.
- Singh, S., and Das, S. 2011. Screening, production, optimization and characterization of cyanobacterial polysaccharide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27(9): 1971-1980.
- Sirohi, R., Pandey, J. P., Gaur, V. K., Gnansounou, E., and Sindhu, R. 2020. Critical overview of biomass feedstocks as sustainable substrates for the production of polyhydroxybutyrate (PHB). *Bioresource Technology* : 123536.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312-1313
- Tiwari, O.N. et al. 2019. Purification, characterization and biotechnological potential of new exopolysaccharide polymers produced by cyanobacterium *Anabaena* sp. CCC 745. *Polymer* 2019(178): 121695.

- Troschl, C., Meixner, K., and Drosig, B. 2017. Cyanobacterial PHA production-review of recent advances and a summary of three years' working experience running a pilot plant. *Bioengineering* 4(2): 26.
- Troschl, C. et al. 2018. Pilot-scale production of poly- β -hydroxybutyrate with the cyanobacterium *Synechocystis* sp. CCALA192 in a non-sterile tubular photobioreactor. *Algal Research* 34: 116-125.
- Velázquez-Suárez, C., Luque, I., and Herrero, A. 2020. The inorganic nutrient regime and the *mre* genes regulate cell and filament size and morphology in the phototrophic multicellular bacterium *Anabaena*. *MSphere* 5(5).
- Wang, H. B., Wu, S. J., and Liu, D. 2014. Preparation of polysaccharides from cyanobacteria *Nostoc commune* and their antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers* 99: 553-555.
- Wang, L. F. and Rhim, J. W. 2015. Preparation and application of agar/alginate/collagen ternary blend functional food packaging films. *International Journal of Biological Macromolecules* 80: 460-468.
- Wu, G. F., Wu, Q. Y., and Shen, Z. Y. 2001. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Bioresource technology* 76(2): 85-90.
- Yadav, G. et al. 2021. Lipid content, biomass density, fatty acid as selection markers for evaluating the suitability of four fast growing cyanobacterial strains for biodiesel production. *Bioresource Technology* 325: 124654.

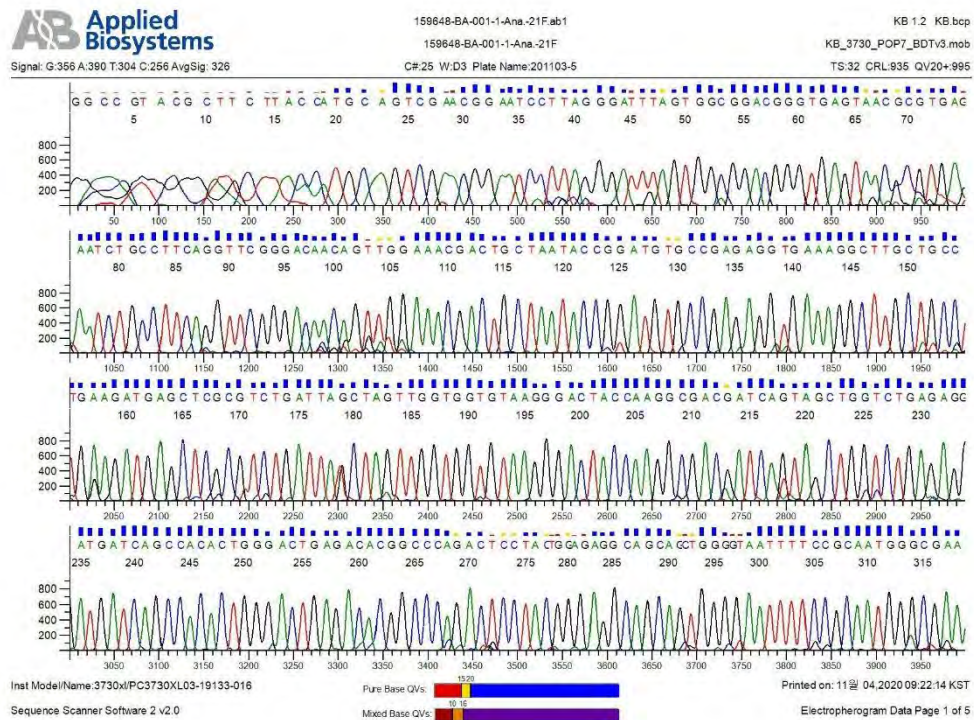
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงสาหร่าย

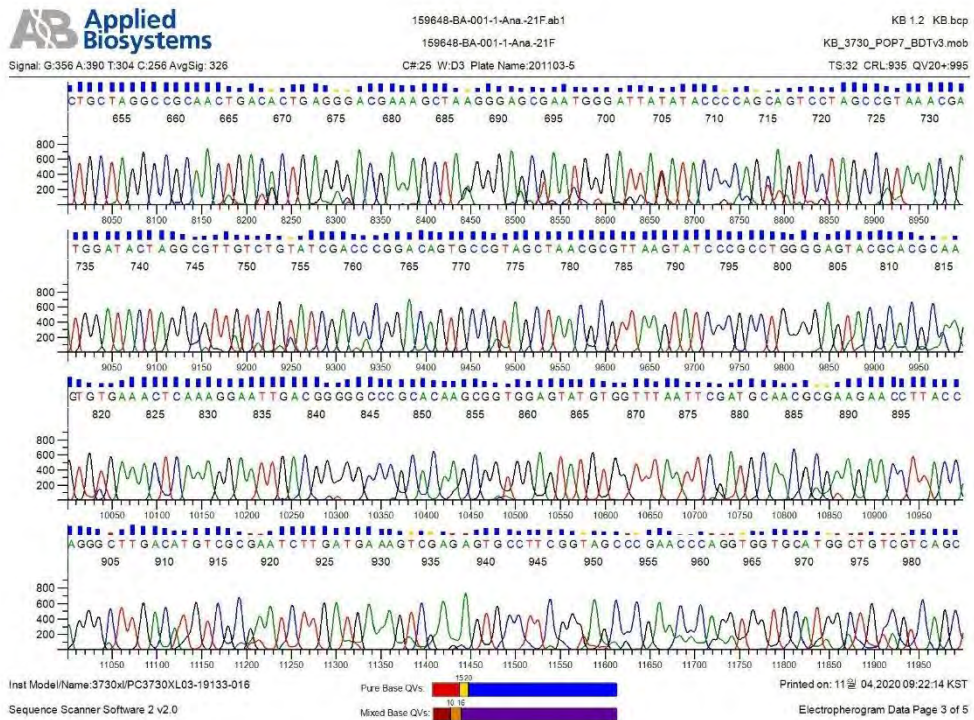
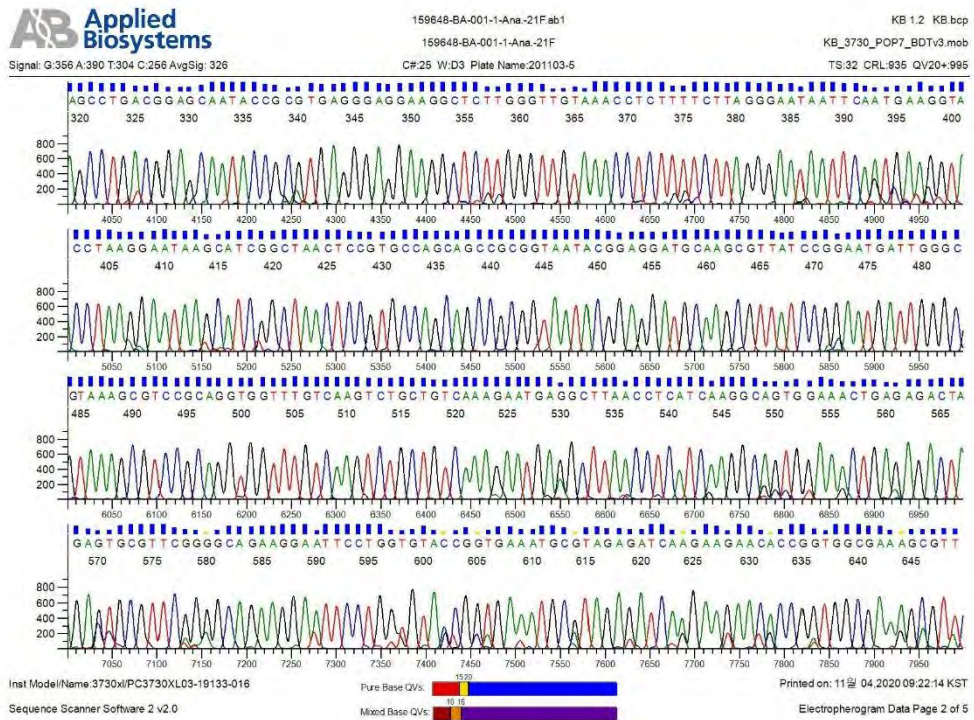
ตารางที่ 1ผ สูตรอาหารเหลวเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย

สารประกอบ	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)		
	BG-11	BG-11 ₀	BBM
NaNO ₃	1.5	-	0.25
K ₂ HPO ₄	0.04	0.04	0.075
KH ₂ PO ₄	-	-	0.175
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075	0.075	0.075
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.036	0.036	0.025
Na ₂ CO ₃	0.02	0.02	-
NaCl	-	-	0.025
citric acid	0.006	0.006	-
Ferric ammonium citrate	0.006	0.006	-
EDTA (disodium salt)	0.001	0.001	0.05
KOH	-	-	0.031
H ₃ BO ₃	-	-	0.0114
Solution (กรัม/ลิตร)	-	-	1.0 ml·l ⁻¹
● FeSO ₄ ·7H ₂ O			4.98
● Conc. H ₂ SO ₄			1.0 ml·l ⁻¹
Trace-metal mix A5 (กรัม/ลิตร)	1.0 ml·l ⁻¹	1.0 ml·l ⁻¹	1.0 ml·l ⁻¹
● H ₃ BO ₃	2.86	2.86	-
● MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81	1.81	1.44
● ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.222	0.222	8.82
● Na ₃ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.039	0.039	-
● MoO ₃	-	-	0.71
● CuSO ₂ ·5H ₂ O	0.079	0.079	1.57
● Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.049	0.049	0.94

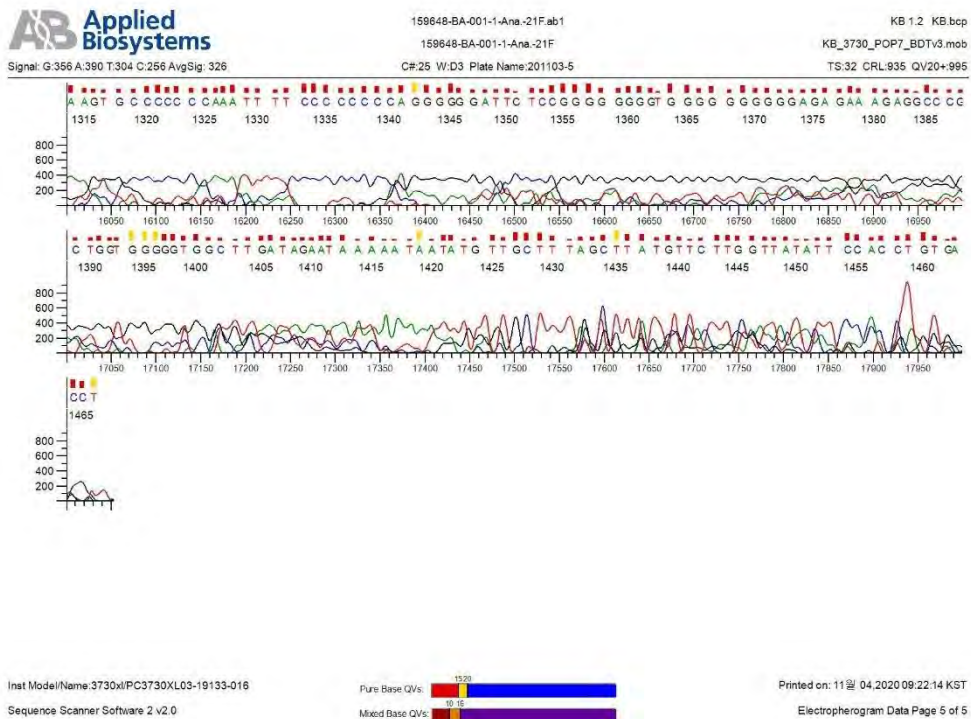
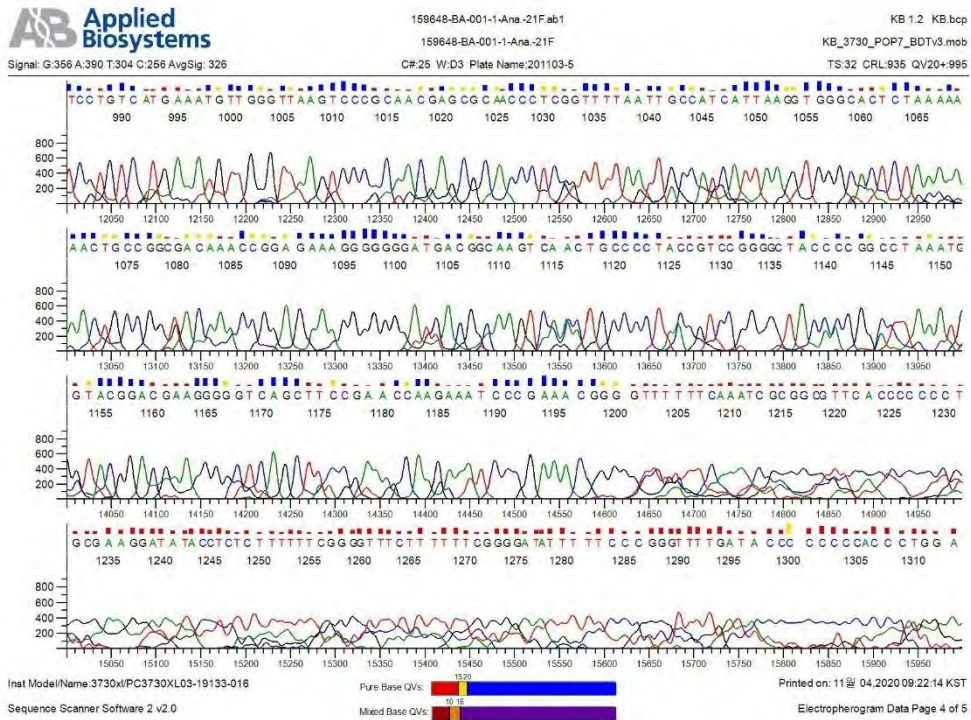
ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ forward primer และ reverse primer ของ
เครื่องหมายยีน 16S rDNA



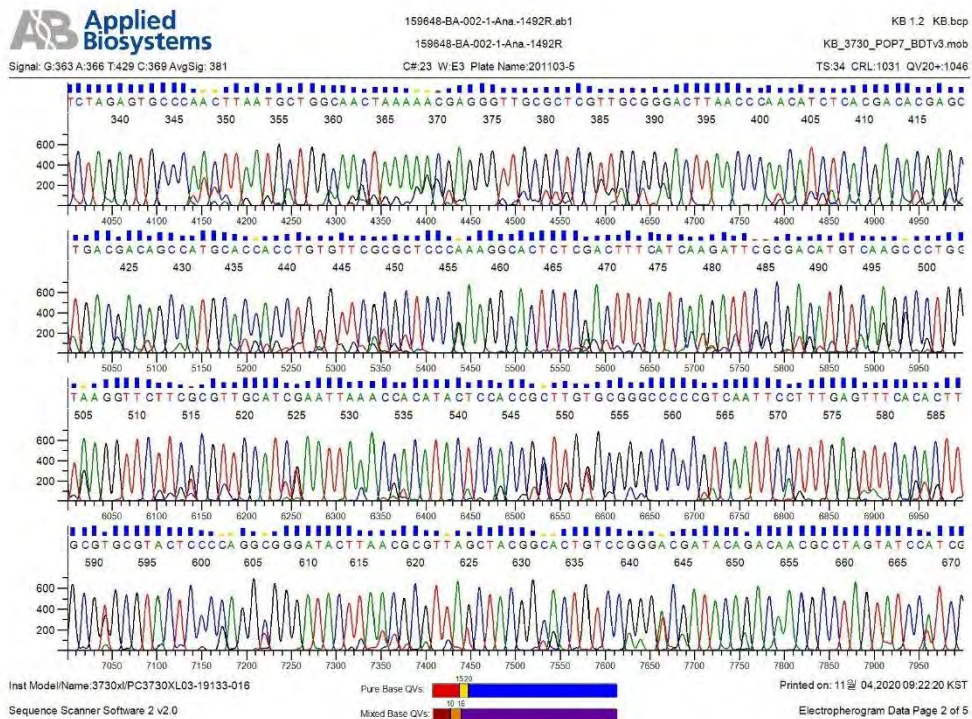
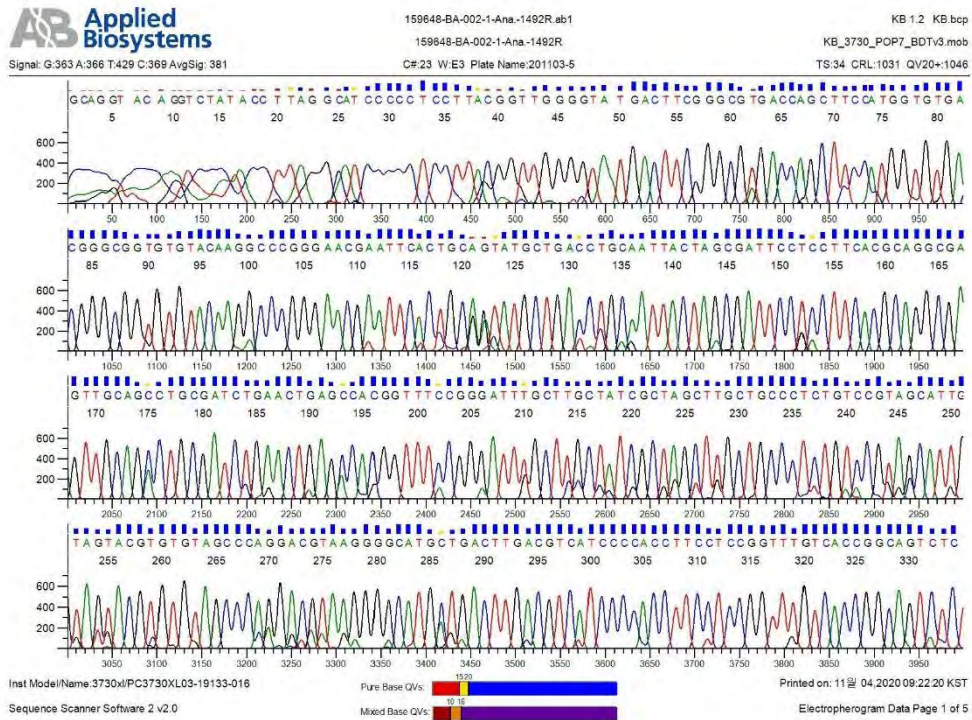
รูปที่ 1ผ chromatogram จาก forward primer: 21F ของเครื่องหมายยีน 16S rDNA ของ *Anabaena* sp.



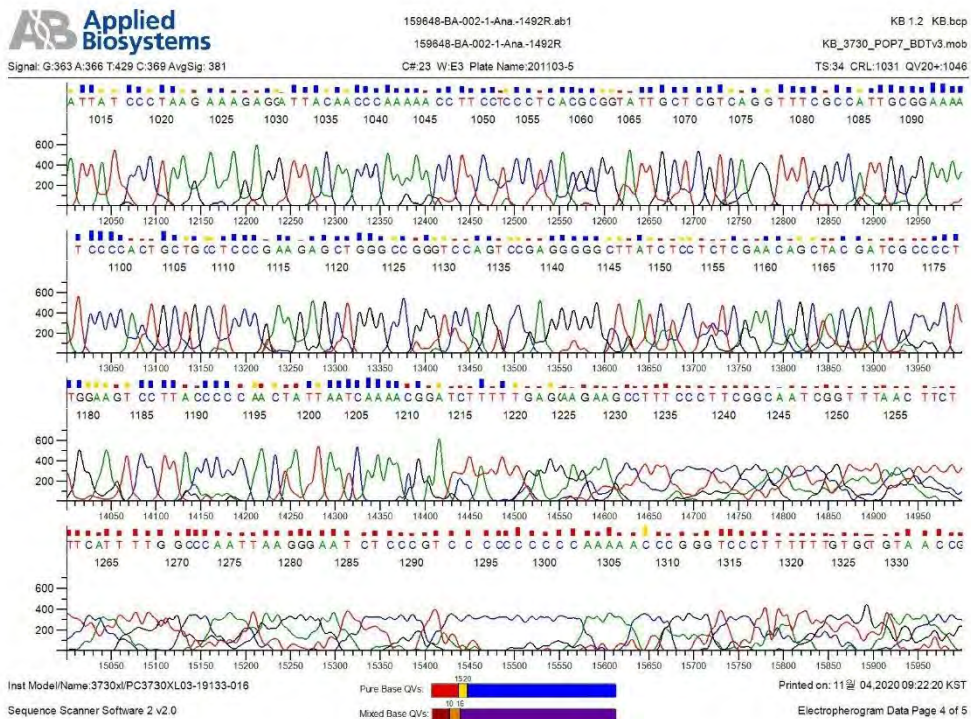
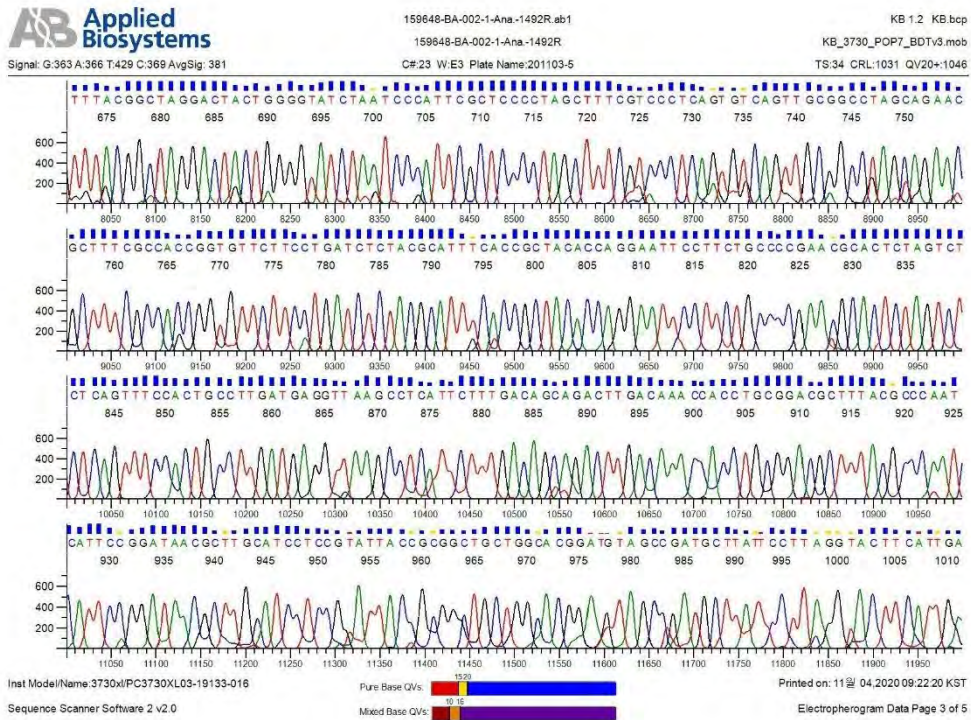
รูปที่ 1ม (ต่อ)



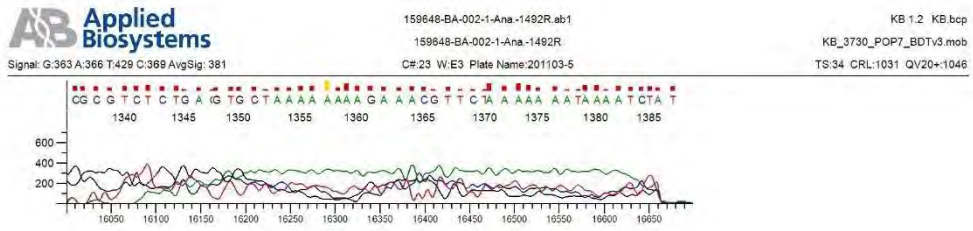
รูปที่ 1ผ (ต่อ)



รูปที่ 2ผ chromatogram จาก reverse primer: 1492R ของเครื่องหมายยีน 16S rDNA ของ *Anabaena sp.*



รูปที่ 2ผ (ต่อ)



Inst Model/Name:3730xl/PC3730XL03-19133-016
Sequence Scanner Software 2 v2.0



Printed on: 11 월 04, 2020 09:22:20 KST
Electropherogram Data Page 5 of 5

รูปที่ 2ผ (ต่อ)