การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากกรดไขมันของน้ำมันปาล์ม โดยใช้เชื้อ *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358

ตติยา บรรดาศักดิ์[1] ผุสชา พลชำนิ[1] ปิ่นอนงค์ ธนิกกุล[2] วนัสพรรัศม์ สวัสดี[3]
และ นิพนธ์ พิสุทธิ์ไพศาล[1,2*]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นกรดไขมันจากปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชั่นของน้ำมันปาล์ม โดยใช้ *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 ด้วยกระบวนการหมักแบบกะในตู้บ่มเขย่า ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที สภาวะอุณหภูมิ 30°C ทำการทดลองโดยแปรผันความเข้มข้นของกรดไขมันในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น ได้แก่ 0.50, 0.75, 1.00 และ 1.50% โดยมวลต่อปริมาตร ค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.0 จากผลการทดลอง พบว่า ความเข้มข้นของกรดไขมันนั้น มีผลต่อการเจริญเติบโต ค่าความเป็นกรดด่าง การผลิตและการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของ *P. fluorescens* TISTR 358 โดยน้ำหนักเซลล์จุลินทรีย์แห้งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ อย่างต่อเนื่อง และสูงสุดในชั่วโมงการหมักที่ 48 เท่ากับ 1.63, 1.60, 1.08 และ 1.05 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้น 0.50, 0.75, 1.00 และ 1.50% โดยมวลต่อปริมาตร ตามลำดับ ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต สูงสุดที่เชื้อผลิตและสะสมไว้ตลอดระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง เท่ากับ 0.17 กรัมต่อลิตร (12.61%) ที่ความเข้มข้นกรดไขมัน 0.50% โดยมวลต่อปริมาตร เซลล์จุลินทรีย์มีการเรืองแสงสีแดงของสีย้อม Nile red เมื่อนำไปส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ และเห็นลักษณะแกรนูลพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สะสมอยู่ภายในตัวเซลล์จุลินทรีย์ เมื่อนำไปส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อ *P. fluorescens* TISTR 358 สามารถใช้ กรดไขมันจากน้ำมันปาล์ม เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตและสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตไว้ภายในเซลล์ได้

คำสำคัญ : พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต, *Pseudomonas fluorescens*, น้ำมันปาล์ม, กรดไขมัน

---

[1] ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร อาหาร และสิ่งแวดล้อม, คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
[2] ศูนย์ไบโอเซ็นเซอร์และไบโออิเล็กทรอนิกส์, สำนักวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
[3] สาขาวิชาสิ่งแวดล้อมศึกษา, วิทยาลัยนวัตกรรมการจัดการ, มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
[*] ผู้ติดต่อ, อีเมล์: nipon.p@sci.kmutnb.ac.th รับเมื่อ 10 มกราคม 2561 ตอบรับเมื่อ 1 พฤษภาคม 2561

Polyhydroxyalkanoates Production from Fatty Acids of Palm Oil using *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358

Tatiya Bhandasak[1], Pusacha Ponchumni[1], Pinanong Tanikkul[2], Vanatpornratt Sawasdee[3] and Nipon Pisutpaisal[1,2*]

Abstract

This study aimed to investigate the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from fatty acids of saponified palm oil as a carbon source using *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358. The batch experiments were setup in an incubator shaker with 180 rpm at 30ºC. Varying the concentrations of fatty acids including 0.50, 0.75, 1.00 and 1.50% (w/v), respectively and initial pH 7.0. The results showed that the concentrations of carbon sources influenced cell growth, pH and the PHAs production. The maximum of cell dry weight were 1.63, 1.60, 1.08 and 1.05 g L^{-1} which were observed in fatty acids concentrations of 0.50, 0.75, 1.00 and 1.50% (w/v), respectively at 48 hrs incubation. The highest PHAs content after 72 hrs incubation was 12.61% (0.17 g L^{-1}) of fatty acids concentrations was 0.50% (w/v). The microbial cells showed high red fluorescent, when the cells were determined using the fluorescent dye Nile red and the PHAs granule of intracellular the microbial cell were seen by transmission electron microscope. The results indicated that *P. fluorescens* TISTR 358 could produce PHAs in an intracellular by using fatty acids from palm oil.

Keywords : Polyhydroxyalkanoates, *Pseudomonas fluorescens*, Palm oil, Fatty acids

[1] Department of Agro-Industrial, Food and Environmental Technology, Faculty of Applied Science, King Mongkut University of Technology North Bangkok.

[2] The Biosensor and Bioelectronics Technology Centre, King Mongkut University of Technology North Bangkok.

[3] Department of Environmental Studies, College of Innovative Management, Valaya Alongkorn Rajabhat University under The Royal Patronage.

[*] Corresponding author, E-mail: nipon.p@sci.kmutnb.ac.th Received 10 January 2018, Accepted 1 May 2018

1. บทนำ

เนื่องด้วยในปัจจุบันนี้มีแนวโน้มการนำผลิตภัณฑ์พลาสติกมาใช้กันอย่างแพร่หลายในชีวิตประจำวันของมนุษย์ ซึ่งพลาสติกเหล่านี้ผลิตมาจากปิโตรเคมี มีคุณสมบัติย่อยสลายได้ยากและใช้ระยะเวลานานในการย่อยสลาย จึงทำให้เกิดการสะสมและก่อให้เกิดปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะในด้านการกำจัดพลาสติกของเสีย เนื่องจากการนำพลาสติกเหล่านี้ไปเผาทำลายจะก่อให้เกิดก๊าซพิษ ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดภาวะโลกร้อน ดังนั้นจึงมีการวิจัยและพัฒนาพลาสติกที่มีความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable plastic) หรือพลาสติกชีวภาพขึ้นมา โดยพลาสติกชีวภาพที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน อาทิเช่น พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrates, PHBs) พอลิแลกติกแอซิด (Polylactic acid, PLA) และพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates, PHAs) ที่กำลังเป็นที่สนใจกันอย่างมากในขณะนี้ [1-2] เนื่องด้วยพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เป็นสารประเภทพอลิเอสเตอร์ (polyester) ที่สังเคราะห์ได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยอาศัยจุลินทรีย์ในการสังเคราะห์ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติทางกายภาพที่โดดเด่นหลายประการ เช่น มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ทนต่อความร้อน (Thermoplastic) มีความยืดหยุ่นเช่นเดียวกับยางธรรมชาติ (Elastometric) ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับพลาสติกสังเคราะห์ประเภท พอลิเอธิลีน (Polyethylene; PE) และพอลิโพรพิลีน (Polypropylene) [1] การนำพลาสติกประเภทพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ แทนพลาสติกที่ผลิตมาจากปิโตรเคมี [2] จึงเป็นการช่วยลดผลกระทบที่จะเกิดขึ้นกับสิ่งแวดล้อมในระยะยาว จากปริมาณการใช้พลาสติกที่เพิ่มสูงขึ้น

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชน้ำมัน ที่มีศักยภาพในการแข่งขันสูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่น ทั้งด้านการผลิตและการตลาด ส่วนแบ่งการผลิตน้ำมันปาล์มต่อน้ำมันพืชของโลก มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง และรวดเร็ว คาดว่าจะเพิ่มสูงขึ้นเป็นร้อยละ 31.2 ในช่วงปี 2549-2563 [3] ในประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกและผลิตน้ำมันปาล์มเป็นอันดับ 3 ของโลก น้ำมันปาล์มนั้นนอกจากจะมีบทบาทสำคัญในธุรกิจน้ำมันพืชเพื่อการบริโภค และเป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมต่างๆ แล้วนั้น น้ำมันปาล์มยังมีบทบาทสำคัญสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติกชีวภาพประเภท พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้อีกด้วย

มีงานวิจัยที่มีการศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต จากน้ำมันพืชชนิดต่างๆ อาทิเช่น น้ำมันรำข้าว น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันดอกคาโนลา และน้ำมันข้าวโพด ด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าสามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ปริมาณ 15-23.5% [4] ซึ่งปริมาณที่ได้ใกล้เคียงกันกับเมื่อใช้แบคทีเรีย *Pseudomonas oleovorans* เมื่อใช้น้ำมันพืชชนิดเดียวกัน ในขณะที่เมื่อนำแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens S48* มาผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พบว่า สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากน้ำมันข้าวโพดได้ถึง 52% และจากน้ำมันถั่วเหลือง 76% [5] ทั้งนี้ปริมาณที่ผลิตได้จะขึ้นอยู่กับชนิดสารตั้งต้นและแบคทีเรียที่ใช้

ในงานวิจัยนี้ จึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต รวมถึงประสิทธิภาพการผลิต โดยใช้กรดไขมันจากปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชันของน้ำมันปาล์มเป็นสารตั้งต้น โดยใช้เชื้อ *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 ด้วยกระบวนการทางชีวภาพภายใต้สภาวะต่างๆ และวิเคราะห์ผลผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ได้ เพื่อนำไปเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่อไป

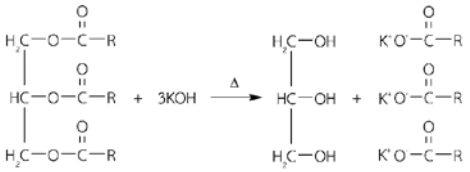
2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 ที่ใช้ในงานวิจัย มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) มีลักษณะเป็นผงอยู่ในรูปของหลอดเชื้อแห้งแข็ง นำมาเพิ่มจำนวนเซลล์และเก็บรักษาหัวเชื้อ ณ เวลาที่มีอัตราการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง late logarithmic phase โดยเติมกลีเซอรอล ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรเชื้อต่อปริมาตรกลีเซอรอล 30%) แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

2.2 กรดไขมันและอาหารเลี้ยงเชื้อ

กรดไขมันจากปฏิกิริยาสปอนนิฟิเคชั่นของน้ำมันปาล์ม มีขั้นตอนการเตรียมดังนี้ น้ำมันปาล์ม 8.0 กรัม เติมสารละลายผสมของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 2.8 กรัม ละลายในเอทานอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงไปนำไปทำการรีฟลักซ์แบบเปิดบนเตาหลุม เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชัน ดังรูปที่ 1 จากนั้นนำไประเหยเอทานอลออกจนหมด ด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) [6] จะได้ของแข็งในรูปเกลือของกรดไขมันที่มีลักษณะเป็นผงสีขาวขุ่น ก่อนนำไปทำการทดลองจะนำมาละลายในน้ำกลั่นตามความเข้มข้นที่ต้องการ และปรับค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.0



ไตรกลีเซอร์ไรด์ (Triglyceride) กลีเซอรอล (Glycerol) สบู่ (soap)

รูปที่ 1 ปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชันของน้ำมันปาล์ม

อาหารเลี้ยงเชื้อจะประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป (Nutrient broth; NB) และอาหารเลี้ยงเชื้อกลุ่มแร่ธาตุ (Mineral Salt Medium; MSM) ที่ประกอบด้วย ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) 2.0 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 0.6 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.2 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 กรัม yeast extract 1.0 กรัม และ trace element 1 มิลลิลิตร (ซิงค์-ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$) 1.3 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 0.2 กรัม เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$) 0.2 กรัม แอมโมเนียมโมลิบเดท ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) 0.6 กรัม และกรดบอริก (H_3BO_3) 0.6 กรัม [7] ทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

2.3 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อ *P. fluorescens* TISTR 358 ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C นำมาถ่ายลงในอาหาร NB แล้วนำไปบ่มในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เพื่อเป็นการกระตุ้นและเพิ่มจำนวน โดยเชื้อแบคทีเรียมีการเติบโตสูงสุดในช่วง late logarithmic phase ระหว่างชั่วโมงที่ 8-18 จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง ที่อุณหภูมิ 4°C ด้วยความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์แบคทีเรียออกมา จากนั้นล้างตะกอนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM จำนวน 2 ครั้ง ทำการรวมตะกอน นำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แบคทีเรียแห้ง (Cell dry weight, CDW) และจำนวนเซลล์แบคทีเรีย (Colony Forming Unit; CFU) เพื่อนำไปสร้างกราฟหาความสัมพันธ์น้ำหนักเซลล์แห้งต่อปริมาณแบคทีเรีย (CDW:CFU) และนำไปคำนวณเพื่อหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นที่ใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.4 การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากกรดไขมัน

การทดลองศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของกรดไขมันต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยแปรผันความเข้มข้นของกรดไขมัน ได้แก่ 0.50, 0.75, 1.00 และ 1.50% โดยมวลต่อปริมาตร ตามลำดับ ลงในอาหาร MSM ปริมาตรรวม 300 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 จากนั้นถ่ายเชื้อเริ่มต้นลงในขวดหมักแต่ละขวด ปริมาตร 6.38 มิลลิลิตร (4.7×10^{11} โคโลนีต่อมิลลิลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C ที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที แล้วทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง และการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในเซลล์แบคทีเรีย

3. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.1 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

นำตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตร ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำ DI จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นรวมตะกอนเซลล์ แล้วนำไประเหยแห้งด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปใส่ในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก [8]

3.2 การวิเคราะห์ลักษณะการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

ตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่าง เติมฟอร์มาลีน 30% ปริมาตร 15 ไมโครลิตร จากนั้นเขย่า 15 ครั้ง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำ DI จำนวน 2 ครั้ง เทน้ำส่วนใสออก นำตะกอนเซลล์แบคทีเรียไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18°C [9]

เมื่อนำไปส่องกล้องตรวจวิเคราะห์ ให้หยดน้ำ DI ลงบนแผ่นสไลด์เล็กน้อย ใช้ลวดเขี่ยเชื้อมาเสมียร์ให้กระจายบางๆ ทั่วบริเวณเล็กๆ บนแผ่นสไลด์ ทำให้รอยเสมียร์แห้ง โดยนำแผ่นสไลด์มาผ่านเหนือเปลวไฟ โดยให้เปลวไฟผ่านใต้สไลด์ตรงรอยเสมียร์อย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง เพื่อเป็นการดึงน้ำออกจากเซลล์ทำให้เซลล์ตรึงแน่นกับสไลด์ จากนั้นหยดสารละลายสี Nile red ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ให้ท่วมรอยเสมียร์ ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ล้างออกด้วยน้ำ DI เบาๆ ซับน้ำที่สไลด์ให้แห้ง ก่อนนำไปส่องการเรืองแสงของ

เซลล์แบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescence Microscope type 020 518.500 DM/LS II/99)

3.3 การวิเคราะห์ลักษณะการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ตัวอย่างจากขวดหมักนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 นาที เติมสารละลายกลูตารัลดิไฮด์ (Glutaraldehyde) 2.5% ในสารละลายบัฟเฟอร์ (PBS) 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.4 ทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ทำการตรึงเซลล์ด้วยสารละลายออสเมียมเตตรอกไซด์ (Osmium tetraoxide) 1.0% ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วยสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที จากนั้นเป็นขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยการแทนที่น้ำด้วยเอทานอลความเข้มข้น 30, 50, 70, 80, 90, 95 และ 100% ตามลำดับ ความเข้มข้นละ 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที จากนั้นค่อยๆ แทนที่เอทานอล ด้วยสารละลายผสมระหว่างโพรพิลีน-ออกไซด์และเอทานอล ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยสารละลายโพรพิลีนออกไซด์บริสุทธิ์ เป็นเวลา 15 นาที โดยในทุกขั้นตอนจะทำที่อุณหภูมิ 4°C หลังจากนั้นจะเป็นการแทนที่ด้วยเรซิน การเตรียมเรซิน โดยผสมเรซินและสารละลายโพรพิลีนออกไซด์ เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 3:1, 1:1 และ 1:3 ตามลำดับ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง อัตราส่วนละ 1 ชั่วโมง และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาข้ามคืนที่อัตราส่วน 1:3

ขั้นตอนสุดท้ายเป็นการฝังตัวอย่างเซลล์แบคทีเรียลงในเรซิน โดยนำตัวอย่างใส่ลงในบล็อกพลาสติก แล้วเติมเรซินที่อยู่ในสภาพของเหลวลงในบล็อกพลาสติก นำไปอบด้วยเตาอบที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 2 วัน และที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 2 วัน ตามลำดับ เพื่อให้เรซินแข็งตัว จากนั้นนำตัวอย่างมาตัดด้วยเครื่องตัดตัวอย่างบางพิเศษ (Ultramicrotome) ด้วยใบมีดแก้วให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมูขนาดเล็ก ขนาดประมาณ 60-90 นาโนเมตร จากนั้นนำตัวอย่างวางบนกริด นำไปย้อมด้วยสารละลายเลดซิเตรท (Lead citrate) เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นย้อมด้วยสารละลายยูเรนิลอะซิเตท (Uranyl acetate) ความเข้มข้น 1.0-2.0% ในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นนำกริดที่มีชิ้นตัวอย่างวางบนกระดาษกรอง ทำให้แห้งและปล่อยไว้ข้ามคืน จากนั้นนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM รุ่น TECNAI 20 TWIN)

3.4 การเตรียมเซลล์แห้งเพื่อสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

การทำเซลล์แบคทีเรียแห้งโดยนำอาหารในขวดหมักไปหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์แบคทีเรียออกมา แล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% จากนั้นนำตะกอนไประเหยให้แห้งแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง [10] ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักจนน้ำหนักคงที่

3.5 การสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตออกจากเซลล์แบคทีเรีย

ตะกอนเซลล์แห้งปริมาณ 0.5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมเอทานอล 95% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แช่ตะกอนแบคทีเรียทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นแยกส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์แบคทีเรียออกใส่ใน Cellulose Extraction Thimble นำไปสกัดด้วยเครื่องสกัดซอกฮ์เลต โดยมีไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เป็นตัวทำละลาย ทำการสกัดเป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นระเหยไดคลอโรมีเทนออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator ยี่ห้อบูชิ รุ่น R II, Switzerland) แล้วนำขวดก้นกลมไปอบที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง [10] นำไปใส่ในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนักจนกว่าจะคงที่

4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นกรดไขมันต่อการผลิตและสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

4.1.1 ค่าความเป็นกรดด่าง

อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นในช่วง 7.18-7.26 และมีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็ว ในช่วงระยะเวลาการหมักที่ 0-24 ชั่วโมง อยู่ในช่วง 6.60-6.68 ในทุกความเข้มข้นของกรดไขมัน (รูปที่ 2) หลังจากชั่วโมงการหมักที่ 24 ค่าความเป็นกรดด่างยังคงลดลงเรื่อยๆ ตามความเข้มข้นของกรดไขมันที่ลดลง และลดลงต่ำสุดที่ความเข้มข้นกรดไขมัน 0.50% โดยมวลต่อปริมาตร จนสิ้นสุดการหมักที่ 72 ชั่วโมง อยู่ในช่วง 6.17-6.45 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นนั้น มีผลต่อการเจริญเติบโต และการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต จึงควรควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม ในขณะที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไปนั้น จะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อแบคทีเรียและแหล่งคาร์บอนที่ใช้ [10] ค่าความเป็นกรดด่างในการทดลองนี้ลดลงอย่างมาก แต่ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งยังคงเพิ่มขึ้น (รูปที่ 2 และ 3) และปริมาณเซลล์แห้งเริ่มคงที่ เมื่อค่าความเป็นกรดด่างเริ่มคงที่ด้วยเช่นกัน ในทุกความเข้มข้นกรดไขมัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Grothe et al., (1999) [11] ที่พบว่าค่าความเป็นกรดด่างของอาหารสามารถลดลงได้ถึง 5.5 เมื่อ *Alcaligenes latus* ATCC 29713 เจริญเข้าสู่ระยะ log phase แต่ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ยังคงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ

4.1.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง

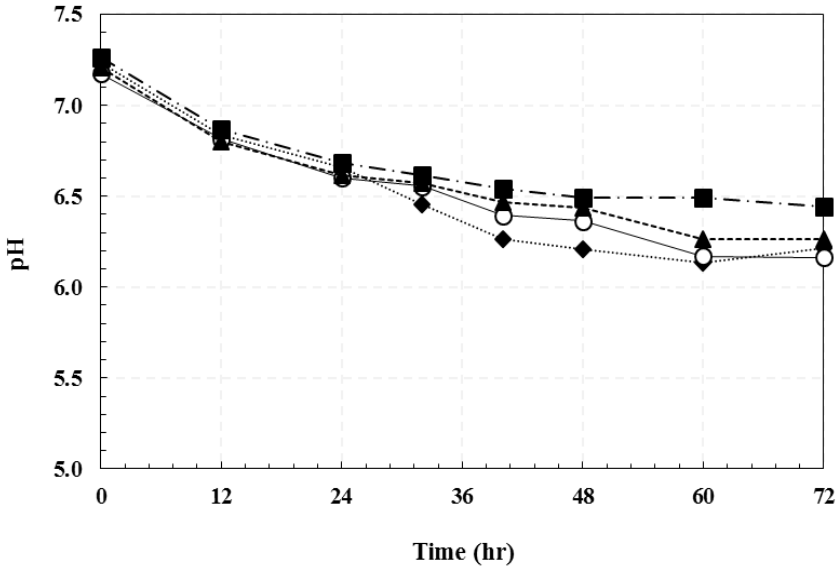
ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของกรดไขมันแต่ละความเข้มข้น มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาของการหมัก โดยจะเห็นได้ว่า ชั่วโมงการหมักที่ 0-12 มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ดังรูปที่ 3 เนื่องจากแบคทีเรียมีการย่อยสลายกรดไขมันประเภทไม่อิ่มตัวที่ย่อยสลายได้ง่ายก่อน ประกอบกับมีแหล่งไนโตรเจนที่มากพอทำให้มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว แต่ที่ความเข้มข้น 0.50% โดยมวลต่อปริมาตรนั้น น้ำหนักเซลล์แห้งจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ อย่างต่อเนื่อง อาจเป็นเพราะความเข้มข้นของกรดไขมันที่ต่ำและอยู่ในสภาวะที่มีสารอาหารที่สมดุลกันระหว่าง

แหล่งคาร์บอนกับแหล่งไนโตรเจน ทำให้ได้ผลพลอยได้เป็นพลังงานและชีวมวลออกมา [2] แต่ในชั่วโมงการหมักที่ 12-24 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็ว อาจเนื่องมาจากมีการใช้พลังงานที่สะสมไว้ และแบคทีเรียค่อยๆ ย่อยสลายกรดไขมันประเภทอิ่มตัวซึ่งย่อยสลายได้ยากหลังจากนั้นปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมีแนวโน้มค่อยๆ เพิ่มขึ้นอีกครั้งหลังชั่วโมงการหมักที่ 24และในช่วงนี้อาจจะมีการผลิตและสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตซึ่งเป็นช่วงที่อยู่ในสภาวะที่ไม่สมดุล ก็คือมีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอและขาดแหล่งอาหารอื่น ก็คือ ไนโตรเจน ทำให้ในชั่วโมงที่ 48 มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด เท่ากับ 1.63, 1.60, 1.08 และ 1.05 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้น 0.50, 0.75, 1.00 แล 1.50% โดยมวลต่อปริมาตร ตามลำดับ หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งจะลดลงในชั่วโมงที่ 60 และกลับเพิ่มขึ้นอีกครั้งในชั่วโมงที่ 72 ในทุกความเข้มข้นของกรดไขมัน

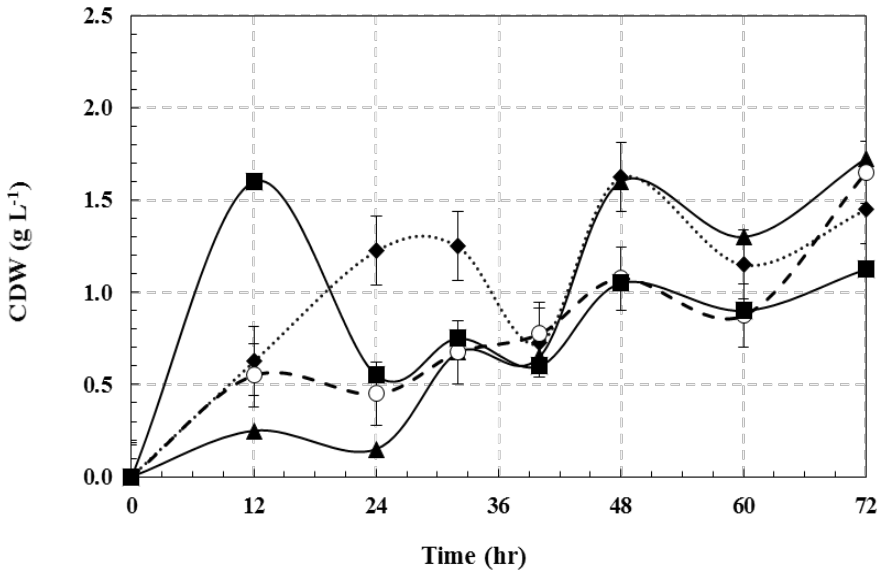
จากการทดลองจะสังเกตได้ว่า เมื่อเปรียบเทียบค่าความเป็นกรดด่างกับน้ำหนักเซลล์แห้งแล้ว มีความสอดคล้องกัน เนื่องจากช่วงที่มีปริมาณเซลล์แห้งสูงสุดจะมีค่าความเป็นกรดด่างลดลงต่ำสุด แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตจากการที่มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลงด้วยเช่นเดียวกัน

4.1.3 การผลิตและสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

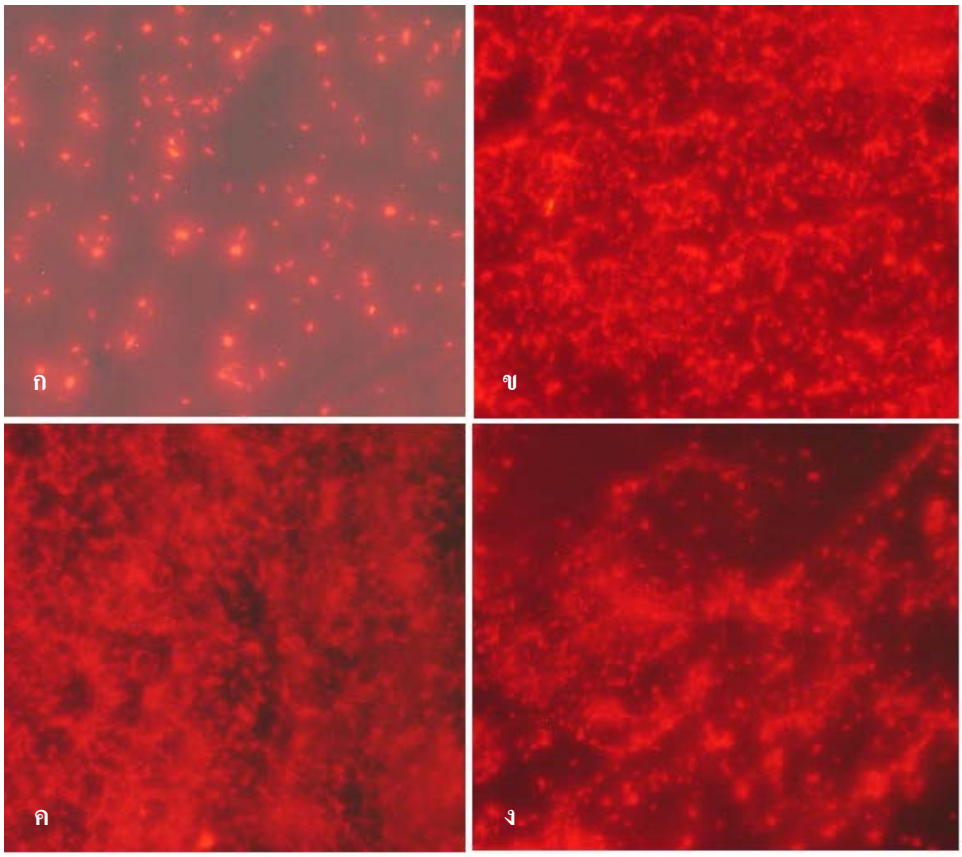
การวิเคราะห์การสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยการส่องกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ จากรูปที่ 4 จะเห็นได้ว่ามีการเรืองแสงสีแดงอ่อนๆ ของตัวเซลล์แบคทีเรียที่ไม่แตกต่างกันมากนัก ในแต่ละความเข้มข้นของกรดไขมัน ที่ชั่วโมงการหมักเดียวกัน (48 ชั่วโมง) แต่จะมีการกระจายตัวของเซลล์แตกต่างกัน ทั้งนี้การวิเคราะห์โดยการย้อมสีเพื่อดูการเรืองแสงนั้น เป็นเพียงการวิเคราะห์เชิงกายภาพเท่านั้น จากการเปรียบเทียบลักษณะการเรืองแสงของเซลล์ จึงไม่สามารถระบุถึงปริมาณการผลิตและการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโน-เอตได้ว่ามีมากหรือน้อยเพียงใด [10] เมื่อเปรียบเทียบการเรืองแสงของเซลล์ในชั่วโมงการหมักที่ 48 และ 60 จะเห็นได้ว่า ในชั่วโมงการหมักที่ 48 จะมีการเรืองแสแดงที่สว่างกว่าชั่วโมงการหมักที่ 60 (รูปที่ 4 และ 5) ในทุกความเข้มข้นของกรดไขมัน สามารถบ่งชี้ได้ว่าในชั่วโมงการหมักที่ 48 เป็นช่วงที่มีการผลิตและสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงกว่าชั่วโมงที่ 60 ทำให้จำนวนแกรนูลหรือพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ที่สะสมไว้ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นและมีขนาดใหญ่ขึ้นจึงทำให้เมื่อนำมาส่องกล้องแล้วจึงติดสีที่แกรนูลได้ดีกว่า ทำให้เห็นการเรืองแสงชัดเจนกว่าในชั่วโมงการหมักที่ 60 นอกจากนี้อาจเป็นเพราะแบคทีเรียมีการนำพลังงานสำรองในรูปแกรนูลพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สะสมไว้มาใช้ หลังจากแหล่งคาร์บอนหมดลง ทำให้การเรืองแสงสีแดงของเซลล์ไม่เด่นชัดเท่ากับชั่วโมงที่ 48 นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับน้ำหนักเซลล์แห้งในชั่วโมงการหมักที่ 60 ที่ลดลงด้วยเช่นเดียวกัน



รูปที่ 2 แสดงค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นกรดไขมัน 0.50 (♦), 0.75 (○), 1.00 (▲) และ 1.50 (■)% โดยมวลต่อปริมาตร ในช่วงระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง



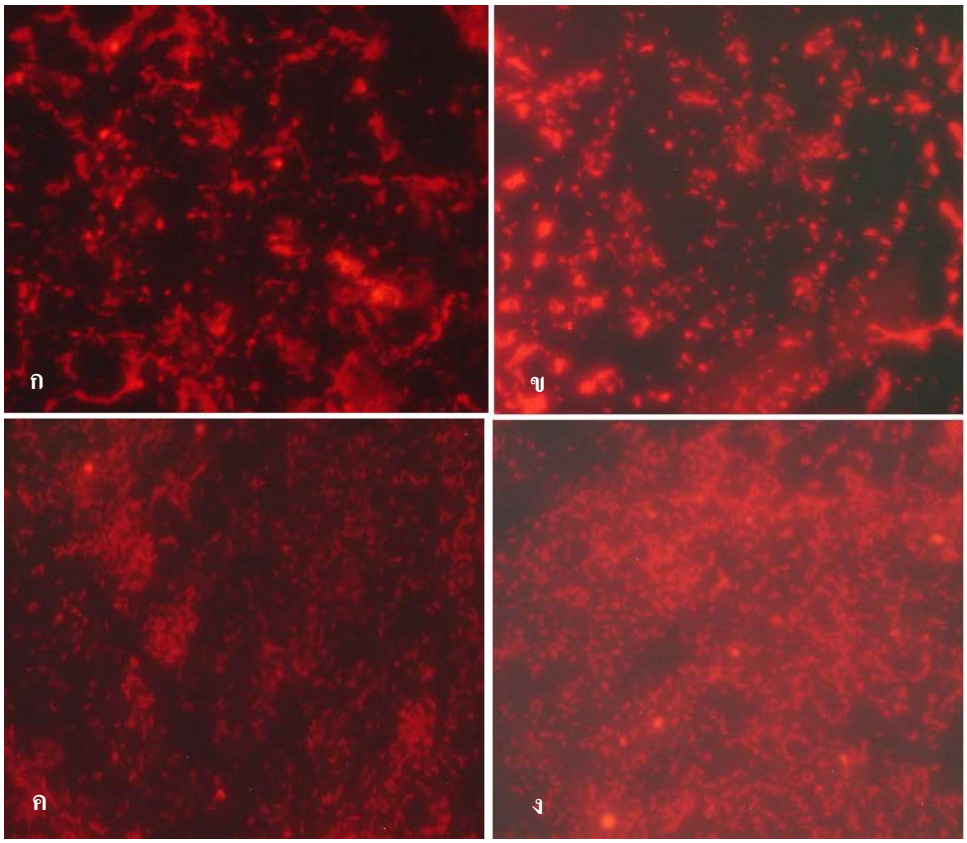
รูปที่ 3 แสดงปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งโดยไม่รวมปริมาณน้ำหนักเซลล์เริ่มต้น ที่ความเข้มข้นของกรดไขมัน 0.50 (♦), 0.75 (○), 1.00 (▲) และ 1.50 (■)% โดยมวลต่อปริมาตร ในช่วงระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง



รูปที่ 4 การติดสี Nile red ของ *P. fluorescens* TISTR 358 ที่มีการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ที่ความเข้มข้นกรดไขมัน 0.50 (ก), 0.75 (ข), 1.00 (ค) และ 1.50 (ง) % โดยมวลต่อปริมาตร ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง กำลังขยาย 400 เท่า

4.1.4 การวิเคราะห์การสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

จากการวิเคราะห์ พบว่าเซลล์ *P. fluorescens* TISTR 358 มีลักษณะเป็นรูปท่อน ภายในเซลล์มีการสะสมพอลิไฮ-ดรอกซีอัลคาโนเอต ลักษณะเป็นแกรนูลสีขาว ลักษณะรี เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.2-0.5 ไมโครเมตร กระจายอยู่ในไซโทพลาสซึมตามความยาวของเซลล์แบคทีเรีย ดังรูปที่ 6 ขนาดของเม็ดแกรนูลจะเพิ่มขึ้นตามการสะสมของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต หากมีการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมากขนาดของเม็ดแกรนูลจะมีขนาดใหญ่ตามไปด้วย จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าวนี้ จึงสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อ *P. fluorescens* TISTR 358 มีความสามารถในการใช้กรดไขมันจากน้ำมันปาล์มเป็นสารตั้งต้นในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้

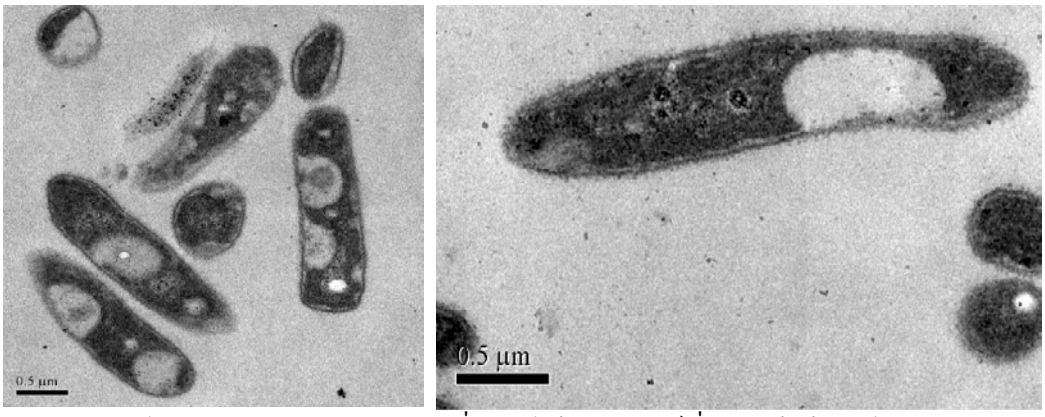


รูปที่ 5 การติดสี Nile red ของ *P. fluorescens* TISTR 358 ที่มีการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ความเข้มข้นกรดไขมัน 0.50 (ก), 0.75 (ข), 1.00 (ค) และ 1.50 (ง) % โดยมวลต่อปริมาตร ระยะเวลาการหมัก 60 ชั่วโมง กำลังขยาย 400 เท่า

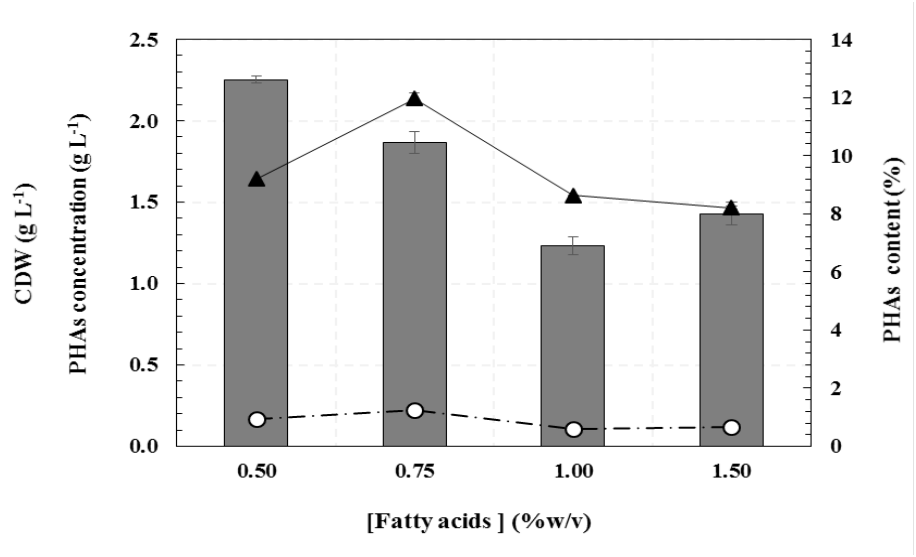
4.2 ปริมาณการผลิตและสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

กรดไขมันที่ความเข้มข้น 0.50, 0.75, 1.00 และ 1.50% โดยมวลต่อปริมาตร มีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ที่สกัดได้ 0.17, 0.22, 0.11 และ 0.12 กรัมต่อลิตร ของน้ำหนักแห้งที่สกัดได้ คิดเป็น12.61, 10.45, 6.90 และ 8.00% ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 7 การพิจารณาการผลิตและสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตนั้นต้องคำนึงถึงหลายๆ ปัจจัยร่วมกัน ไม่ว่าจะเป็นปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต และเปอร์เซ็นต์ผลผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สกัดได้ ร่วมกัน จากกราฟในรูปที่ 7 ความเข้มข้นกรดไขมันที่ 0.75% โดยมวลต่อปริมาตร มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงที่สุด แต่ให้ผลผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตไม่ได้สูงที่สุด ในขณะที่ ความเข้มข้นกรดไขมัน 0.50% โดยมวลต่อปริมาตร มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งน้อยกว่า แต่มีผลผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงที่สุด

สามารถอธิบายได้ว่าปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้นหรือลดลง ไม่ได้บ่งบอกถึงผลผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ที่เซลล์แบคทีเรียสะสมไว้ได้ แบคทีเรียอาจมีการเติบโต แต่จะมีหรือไม่มีการผลิตและสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตก็เป็นได้ ในขณะที่ความเข้มข้น 1.00 และ 1.50% โดยมวลต่อปริมาตร จะเห็นได้ว่ามีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ใกล้เคียงกัน และผลผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตก็ไม่ได้แตกต่างกันมากในเชิงสถิติ



รูปที่ 6 ลักษณะพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตแกรนูล ที่สะสมไว้ภายในเซลล์ ที่ความเข้มข้นกรดไขมัน 1.00% โดยมวลต่อปริมาตร ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง กำลังขยาย 5,000 เท่า



รูปที่ 7 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) (▲), ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร) (○) และผลผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (%) (■) ที่ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง ของกรดไขมันความเข้มข้นต่างๆ

5. สรุปผล

จากการทดลองพบว่า *P. fluorescens* TISTR 358 สามารถผลิตและสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต โดยใช้กรดไขมันจากน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในแต่ละความเข้มข้นของกรดไขมันแตกต่างกันตามระยะเวลาในการหมักที่เพิ่มขึ้น ในชั่วโมงการหมักที่ 48 เป็นช่วงที่แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด ค่าความเป็นกรดด่างลดลงต่ำสุด ส่งผลให้มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด การเรืองแสงสีแดงอ่อนๆของเซลล์แบคทีเรีย และแกรนูลพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในเซลล์ แสดงถึงการผลิตและสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในตัวเซลล์แบคทีเรีย ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคา-โนเอตที่สกัดได้ ที่ความเข้มข้น 0.50% โดยมวลต่อปริมาตร มีผลผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุด 12.61% (0.17 กรัมต่อลิตร) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ากรดไขมันเป็นแหล่งคาร์บอนที่ *P. fluorescens* TISTR 358 สามารถใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตพอลิไฮดรอก-ซีอัลคาโนเอตได้ นอกจากนี้ความเข้มข้นของกรดไขมันที่แตกต่างกันยังมีผลต่อปริมาณการผลิตพอลิไฮดรอก-ซีอัลคาโนเอตอีกด้วย

6. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ (สัญญารับทุนเลขที่ 6144105) ที่ให้ทุนสนับสนุน จนทำให้การวิจัยสำเร็จลุล่วง

7. เอกสารอ้างอิง

[1] S. Suksawat and W. Pathom-aree, “The Role of Bacteria on Bioplastic”, Srinakhrinwirot Science Journal 28(2), 2012. (in Thai)

[2] S. Phol-in, “Screening and Production of Poly-Beta-hydroxybutyrate (PHB) by Marine Microorganism”, Master Thesis, Department of Biotechnology, Silpakorn University, Thailand, 2011.

[3] P. Pornchaloempong, “Palm Oil”, Available: http://www.foodnetworksolution.com, August 2013. (in Thai)

[4] S.R. Silva-Queiroz, L.F. Silva, J.G.C. Pradella, E.M. Pereira and J.G.C. Gomez. “PHA_{MCL} biosynthesis systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* strains show differences on monomer specificities”, Journal of Biotechnology 143(2), 2009, pp. 111-118.

[5] R.F. Gamal, H.M. Abdelhady, E.A. Hassan, T.S. El-Tayeb and K.A. Aboutaleb, “Production of PHAsn from waste frying oil by *Pseudomonas fluorescens S48* using different bioreactor feeding strategies”, Egypt Journal Microbiology, 2012.

[6] I.K.P. Tan, K.S. Kumar, M. Theanmalar, S.N. Gan and B. Gordon, “Saponified palm kernel oil and its major free fatty acids as carbon substrates for the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* PGA1”, Applied Microbiology and Biotechnology 47(3), 1997, pp. 207-211.

[7] J. Snoei, "Fatty acid as an alternative carbon source for MCL-polyhydroxyalanoate production by Pseudomonas Fluorescens SC4 Laboratory of Polymer Technology", International Journal of Latest Research in Science and Technology ISSN 4, 2015.

[8] American Public Health Association, American Water Works Association, "Water Pollution Control Federatiom, Standard methods for the examination of water and wastewater (20th Eds.)", American Public Health Association, Washington DC, 1998.

[9] S. Vatanyoopaisarn, P. Kaothien and R. Chongcharoen, "Laboratory Manual for General Microbiology (2nd Eds.)", King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Bangkok, Thailand, 2006, pp. 13-17.

[10] R. Chongcharoen, "Production of poly-3-hydroxyalkanoate from cheap renewable carbon sources", Science and Technology Research Institute, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, 2009. (in Thai)

[11] E. Grothe, M. Moo-Young and Y. Christi, "Fermentation optimization for production of Poly (β-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic", Enzyme Microb Technology 25, 1999, pp. 132-141.

[12] Y.J. Chen, Y.C. Huang and C.Y. Lee, "Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas mosselii* TO7", Journal of Bioscience and Bioengineering 118(2), 2014, pp. 145-152.

[13] R.F. Gamal, H.M. Abdelhady, E.A. Hassan, T.S. El-Tayeb and K.A. Aboutaleb, "Production of PHAs from waste frying oil by *Pseudomonas fluorescens* S48 using different bioreactor feeding strategies", Egypt Jouanal Microbiology 47(1), 2012, pp.1-15.

[14] P. Kahar, T. Tsuge, K. Taguchi and Y. Doi, "High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain", Polymer Degradation and Stability 83(1), 2004, pp. 79-86.

[15] W. Sengpracha, M.B. Agustin and W. Phutdhawong, "A Survey on the Fatty Acid Composition of Commercial Palm Oil in Thailand", Chemical Science Transactions 1(3), 2012, pp. 612-617.

[16] S. Kanchanasuta, "Utilization of Cassava Pulp and Rice Straw as Feed Stocks for Production of Polyhydroxyalkanoate Bioplastics and Biological Hydrogen Production from Palm Oil Industry Derived Solid Wastes", Master Thesis, Department of Environmental Technology, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Thailand. 2008.