



มหาวิทยาลัยหาดใหญ่
HATYAI UNIVERSITY

การคัดเลือกแบคทีเรียผลิตสารพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร Screening of Polyhydroxybutyrate Producing Bacteria Using Agricultural Waste Substrate

สุนิษา คำเบิก¹, สุตติชา ณ ระนอง ธรรมสิทธิรงค์² และ อานนท์ ธรรมสิทธิรงค์^{3*}
Sunisa Cumberg¹, Sutticha Na-Ranong Thammasittirong² and Anon Thammasittirong^{3*}

¹ นักศึกษาระดับปริญญาโท, หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา, ภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ, คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

¹ Graduate student, Master of Science Program in Microbiology, Department of Science and Bioinnovation, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University.

² รองศาสตราจารย์, ภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ, คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

² Associate professor, Department of Science and Bioinnovation, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University.

³ รองศาสตราจารย์, ภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ, คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

³ Associate professor, Department of Science and Bioinnovation, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University.

*Corresponding author, E-mail: faasant@ku.ac.th

บทคัดย่อ

พลาสติกชีวภาพเป็นหนึ่งในทางเลือกเพื่อลดปัญหาขยะพลาสติกจากปิโตรเคมี แต่ต้นทุนการผลิตที่สูงยังเป็นข้อจำกัดในการผลิตพลาสติกชีวภาพ ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยใช้วัตถุดิบราคาถูกจากขานอ้อยเหลือทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินในจังหวัดนครปฐม พระนครศรีอยุธยา และปทุมธานี รวม 10 แหล่งได้จำนวนแบคทีเรียรวม 101 ไอโซเลตและทดสอบการสร้างและสะสมพลาสติกชีวภาพพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยวิธีย้อมด้วยสีชูดานแบล็คบี ผลการทดลองพบว่าจากการคัดเลือกแบคทีเรียจำนวน 101 ไอโซเลต แบคทีเรียไอโซเลต S77-3 มีการสร้างและสะสมพลาสติกชีวภาพพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงที่สุดที่ 1.68 ± 0.03 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นร้อยละ 62.80 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) หลังจากเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลจากไฮโดรไลเซชันขานอ้อยความเข้มข้นร้อยละ 1.5 เป็นแหล่งคาร์บอน จากการจัดจำแนกสายพันธุ์โดยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต S77-3



มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Bacillus cereus* มากที่สุด จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการผลิตพลาสติกชีวภาพ PHB โดยเชื้อ *B. cereus* S77-3 ด้วยวัตถุดิบราคาถูกจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

คำสำคัญ: พลาสติกชีวภาพ, พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต, ชานอ้อย, ไฮโดรไลเซต

Abstract

Bioplastics is an alternative way to reduce waste from petroleum-based plastics. However, high production cost is a major limitation of bioplastics. The objective of this work is to screen local bacterial isolates for their ability to produce polyhydroxybutyrate (PHB) bioplastic using low-cost sugarcane bagasse waste as carbon source. A total of 101 bacterial isolates were isolated from ten soil samples from Nakhon Pathom, Phra Nakhon Si Ayutthaya, and Pathum Thani provinces and screened for their biosynthesis and accumulation of PHB granules using Sudan black B staining method. The result showed that among 101 bacterial isolates, the isolate S77-3 accumulated the highest amount of PHB granules in cells (1.68 ± 0.03 g/L, 62.80% of cell dry weight) after cultivation in the medium containing 1.5% sugar from sugarcane bagasse hydrolysate as carbon source. Molecular identification based on 16S rDNA sequence analysis revealed that the isolate 77-3 is closely related with *Bacillus cereus*. Results from this work show the possibility of PHB production using low-cost agricultural waste as substrate by *B. cereus* S77-3.

Keywords: Bioplastic, Polyhydroxybutyrate, Sugarcane bagasse, Hydrolysate

บทนำ

พลาสติกเป็นวัสดุที่ผลิตจากปิโตรเคมีที่ได้รับความนิยมในการใช้งานและมีปริมาณการใช้งานเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในสถานการณ์ปกติมีปริมาณขยะมูลฝอยที่เกิดขึ้นในประเทศไทยปีละกว่า 27.8 ล้านตัน โดยเป็นขยะพลาสติกประมาณร้อยละ 12-13 แต่ในช่วงสถานการณ์แพร่ระบาดของโรคโควิด-19 (Covid-19) ที่ผ่านมามีรายงานขยะพลาสติกเพิ่มมากขึ้น เช่น รายงานของกรุงเทพมหานครว่ามีปริมาณขยะพลาสติกทั้งหมด 3,440 ตันต่อวันในเดือนเมษายน พ.ศ. 2563 เพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2562 ที่มีปริมาณขยะพลาสติก 2,120 ตันต่อวัน พลาสติกเป็นวัสดุที่คงทนต่อการย่อยสลายของจุลินทรีย์ ส่งผลให้การสลายตัวโดยธรรมชาติเกิดขึ้นได้ช้ามาก (Mueller, 2006) จากรายงานของ Ohtake et al. (1998) พบว่าการย่อยสลายพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนต้องใช้เวลามากกว่า 100 ปี การกำจัดขยะพลาสติกจึงต้องการกระบวนการที่ถูกต้อง ปัจจุบันในหลายพื้นที่ยังคงกำจัดขยะพลาสติกไม่ถูกวิธี ก่อให้เกิดปัญหาต่าง ๆ ตามมา เช่น ปัญหาต่อสุขภาพ ปัญหาเศรษฐกิจ และปัญหาสิ่งแวดล้อมทั้งทางตรงและทางอ้อม (ณิชา



บุรณสิงห์, 2562) ปัญหาขยะพลาสติกเป็นปัญหาระดับโลกที่ประเทศต่าง ๆ ต้องช่วยกันหาทางแก้ไข โดยในหลายประเทศ เช่น สวีเดน เยอรมนี เดนมาร์ก และอังกฤษ ได้ออกกำหนดนโยบายในการจัดการขยะ รวมถึงมาตรการลดเลิกใช้ถุงพลาสติก และการรณรงค์รีไซเคิล (กองบรรณาธิการ Green Network, 2563) โดยอีกหนึ่งในแนวทางแก้ไขปัญหาคือการใช้พลาสติกชีวภาพ

พลาสติกชีวภาพ (Bioplastics) ได้เข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวันมากขึ้นเนื่องจากเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ ใช้เวลาในการย่อยสลายสั้น พลาสติกชีวภาพเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมถือว่าเป็นวัสดุที่มีการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ หลังจากสิ้นสุดกระบวนการย่อยสลายจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และวิตามิน แร่ธาตุต่าง ๆ ที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันพลาสติกชีวภาพมีอยู่หลายชนิดทั้งพลาสติกที่ผลิตจากวัตถุดิบทางชีวภาพ (Biobased) และวัตถุดิบจากน้ำมันปิโตรเลียม (Petrobased) โดยการผลิตพลาสติกชีวภาพจากวัตถุดิบทางชีวภาพเป็นที่ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากสามารถผลิตวัตถุดิบได้อย่างต่อเนื่องและยั่งยืน โดยพลาสติกชีวภาพ 2 ชนิดที่เป็นที่สนใจของตลาดทั่วโลก รวมถึงในประเทศไทยคือ พอลิแลคติกแอซิด (Polylactic acid: PLA) และพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxy alkanates: PHAs) โดย Akhlaq et al. (2023) รายงานว่า พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตและพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate: PHB) เป็นพลาสติกชีวภาพที่ถูกใช้ทดแทนพลาสติกจากปิโตรเคมีมากที่สุด พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเป็นพอลิเมอร์ในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่มีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีคล้ายกับพอลิเมอร์สังเคราะห์จากปิโตรเคมีคือพอลิโพรพิลีนหรือพอลิเอทิลีนที่สามารถนำมาอัด ปั่น ให้เป็นเส้นสายเพื่อทำเป็นแผ่นฟิล์มได้ โดยพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1926 โดยสกัดได้จากเซลล์ของ *Bacillus megaterium* (Luengo et al., 2003) จากนั้นพบรายงานการผลิตในแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เช่น *Alcaligenes* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Rhodospirillum* sp., *Halobacterium* sp., *Rhizobium* sp. เป็นต้น (Anderson & Dawes, 1990) เชื้อแบคทีเรียสร้างและสะสมพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตไว้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานพบเมื่อเชื้อเจริญในสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมคือมีแหล่งคาร์บอนปริมาณสูงกว่าสารอื่น ๆ เช่น ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส และออกซิเจน (Kadriye Inan et al., 2023) จึงมักพบรายงานการคัดแยกเชื้อผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้จากแหล่งตัวอย่างต่าง ๆ ที่มีสารอินทรีย์สูงโดยเฉพาะในดินที่อุดมสมบูรณ์เป็นต้น (Jeevitha et al., 2023; Kadriye Inan et al., 2023; Thammasittirong et al., 2017)

ปัจจัยหลักที่มีผลต่อต้นทุนในการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อจุลินทรีย์คืออาหารเลี้ยงเชื้อและกระบวนการเก็บเกี่ยวผลผลิต โดยมีรายงานว่าค่าใช้จ่ายสำหรับแหล่งคาร์บอนเพื่อเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักเพื่อผลิตพลาสติกชีวภาพในระดับอุตสาหกรรมมีค่าสูงถึงร้อยละ 50 ของค่าใช้จ่ายทั้งหมดในกระบวนการผลิต (Saratale et al., 2021) ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตพลาสติกชีวภาพสูงกว่าการผลิตพลาสติกจากปิโตรเคมีถึงประมาณ 6 เท่า (Hassan et al., 2024) จึงมี



ความพยายามของนักวิจัยที่จะศึกษาวัสดุทดแทนที่มีราคาถูกกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้า วัสดุลิกโนเซลลูโลสเป็นอีกหนึ่งในวัตถุดิบที่น่าสนใจเนื่องจากเป็นวัสดุที่ได้จากเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีปริมาณมหาศาลและแทบไม่มีมูลค่า วัสดุลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในอัตราส่วนแตกต่างกันขึ้นอยู่กับประเภทของวัสดุลิกโนเซลลูโลส โดยทั่วไปพบเซลลูโลสร้อยละ 40-60 เฮมิเซลลูโลส ร้อยละ 20-30 และ ลิกนิน ร้อยละ 15-30 การนำวัสดุลิกโนเซลลูโลสไปใช้ประโยชน์จำเป็นต้องผ่านกระบวนการปรับสภาพโดยวิธีทางกายภาพ เคมี หรือชีวภาพ (สุภาวดี ผลประเสริฐ, 2557) และใช้เอนไซม์ย่อยโครงสร้างที่ผ่านการปรับสภาพให้ได้หน่วยย่อยคือน้ำตาลที่สามารถนำไปเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ได้ต่อไป

มีงานวิจัยต่าง ๆ ที่ศึกษาการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยใช้ไฮโดรไลเซทจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น Getachew & Woldesenbet (2016) ศึกษาเกี่ยวกับศักยภาพแบคทีเรียที่ผลิตพลาสติกชีวภาพพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยใช้ไฮโดรไลเซทจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส 4 ชนิด คือ ชานอ้อย ชังข้าวโพด ฟางข้าว และเปลือกกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้ดีที่สุดโดยมีการสะสมพลาสติกชีวภาพ ร้อยละ 55.6, 51.6, 37.4 และ 25.0 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้ชานอ้อย ชังข้าวโพด ฟางข้าว และเปลือกกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ Hidayat et al. (2019) ศึกษาเกี่ยวกับความสามารถของแบคทีเรีย *Bacillus cereus* suaeda B-001 ในการสร้างพลาสติกชีวภาพพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยใช้ไฮโดรไลเซทของผลปาล์มน้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอน โดยพบว่า *B. cereus* suaeda B-001 สามารถสะสมพลาสติกชีวภาพได้มากที่สุดร้อยละ 55.44 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้ไฮโดรไลเซทจากผลปาล์มน้ำมันเปล่าความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นต้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตพลาสติกชีวภาพพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้โดยใช้วัตถุดิบราคาถูกลงจากชานอ้อยเหลือทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอน

แนวคิด ทฤษฎี กรอบแนวคิด

จากปัจจัยด้านต้นทุนการผลิตโดยเฉพาะต้นทุนจากแหล่งคาร์บอนยังเป็นข้อจำกัดของการผลิตและใช้พลาสติกชีวภาพเพื่อทดแทนพลาสติกจากปิโตรเคมี หากสามารถหาแหล่งวัตถุดิบที่มีราคาถูกและสามารถค้นหาเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถใช้น้ำตาลจากแหล่งวัตถุดิบราคาถูกดังกล่าวเพื่อใช้ผลิตพลาสติกชีวภาพก็น่าจะส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตพลาสติกชีวภาพถูกลงได้ โดยชานอ้อยเป็นหนึ่งใน วัสดุลิกโนเซลลูโลสเหลือทิ้งทางการเกษตรภายในประเทศที่น่าสนใจ เนื่องจากประเทศไทยการผลิตอ้อยในลำดับต้น ๆ ของโลกและมีปริมาณวัสดุเหลือทิ้งชานอ้อยในปริมาณสูง การนำวัสดุเหลือทิ้งชานอ้อยมาใช้ประโยชน์โดยใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นเพื่อผลิตพลาสติกชีวภาพจึงเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งอีกทางหนึ่ง



วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตพลาสติกชีวภาพ

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณที่มีแหล่งสารอินทรีย์สมบูรณ์ได้แก่ กองขยะ และแปลงเกษตร ในพื้นที่ จังหวัดนครปฐม พระนครศรีอยุธยา และปทุมธานี จำนวน 10 แหล่ง โดยชุดเล็ก 15 เซนติเมตรจากผิวดิน นำตัวอย่างดิน 1 กรัม เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้มีความเจือจาง 10^{-4} ถึง 10^{-6} แล้วดูดสารละลายที่เจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนผิวดินอาหาร Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกเชื้อที่ผลิตพลาสติกชีวภาพได้ในเบื้องต้น โดยเลือกโคโลนีเดียวที่มีลักษณะโคโลนีต่าง ๆ มาทดสอบการผลิตพลาสติกชีวภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นย้อมสีพลาสติกชีวภาพภายในเซลล์ ด้วยสารละลายสี Sudan Black B เป็นเวลา 10 นาที ล้างออกด้วย Xylene จนสี ย้อม Sudan Black B ออกหมด ล้างด้วยน้ำกลั่นและย้อมสีเซลล์ด้วยสีย้อม Safranin O เป็นเวลา 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

2. การปรับสภาพขานอ้อยและเตรียมไฮโดรไลเซต

นำขานอ้อยปั่นด้วยเครื่องปั่นและกรองผ่านตระแกรงกรองขนาดช่องประมาณ 2 มิลลิเมตร นำขานอ้อยที่ผ่านการกรองอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับสภาพ ขานอ้อยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้นร้อยละ 2 แล้วบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง นำขานอ้อยมากรองด้วยผ้าขาวบางและล้างด้วยน้ำกลั่นหลายครั้งจนค่า พีเอช (pH) ลดลงมาถึง 7.0 จากนั้นอบขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 48 ชั่วโมง ชั่งขานอ้อย 10 กรัมใส่ขวดรูปชมพู่กำจัดเชื้อโดยนึ่งภายใต้ความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ซิเตรต (Citrate) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเติมเอนไซม์ Accellerase ที่มีความเข้มข้น 15 filter paper unit (FPU) ต่อกรัมของซับสเตรต เขย่าให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนไฮโดรไลเซตมาปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 7.0 กรอง ผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโดยเจือจางไฮโดรไลเซตในน้ำ ปราศจากไอออน 100 เท่าและดูดสารละลายเจือจางปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลอง เติม Di-nitrosalicylic acid (DNS) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีและทำให้เย็นลงทันที เติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 5 มิลลิลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนจากไฮโดรไลเซตขานอ้อย

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrogen-deficient medium agar ประกอบด้วยน้ำตาลจากไฮโดรไล เซตขานอ้อยร้อยละ 1.5 เปปโตนร้อยละ 0.25 สารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0.25 แมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.02 โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.01 และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.05 ผงวุ้นร้อยละ 1.5



ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 กำจัดเชื้อโดยการนึ่งภายใต้ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อใส่จานอาหาร

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrogen-deficient medium broth โดยมีองค์ประกอบต่าง ๆ ตามด้านบน แต่ไม่เติมผงวุ้น และมีการปรับความเข้มข้นน้ำตาลจากไฮโดรไลเซตเป็นร้อยละ 0.25 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 โดยเตรียมอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

4. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลจากไฮโดรไลเซตของพืชผลผลิตพลาสติกชีวภาพ

นำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นว่าสามารถผลิตพลาสติกชีวภาพได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrogen-deficient medium agar ที่มีน้ำตาลจากไฮโดรไลเซตร้อยละ 1.5 เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์การสร้างและสะสมพลาสติกชีวภาพโดยการย้อมสีเซลล์ด้วยสารละลายสี Sudan Black B ตามวิธีด้านบน แล้วศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

5. ศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลจากไฮโดรไลเซตต่อการสร้างพลาสติกชีวภาพ

นำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกว่าสามารถผลิตพลาสติกชีวภาพได้สูงที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrogen-deficient medium agar มาวิเคราะห์การสร้างพลาสติกชีวภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrogen-deficient medium broth ที่มีน้ำตาลจากไฮโดรไลเซตความเข้มข้นร้อยละ 0.25 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์การสร้างและสะสมพลาสติกชีวภาพ จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณพลาสติกชีวภาพและน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีของ Thammasittirong et al. (2017)

6. การจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย

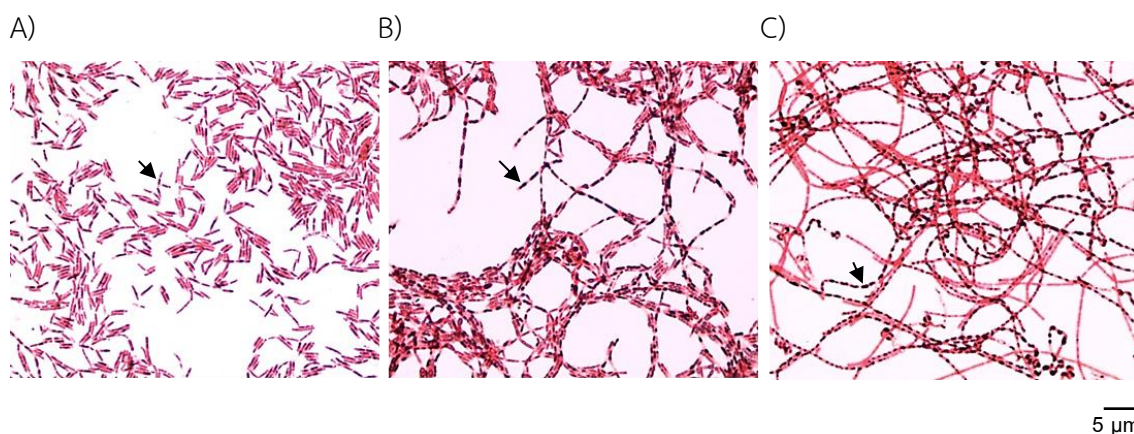
จัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถสร้างพลาสติกชีวภาพได้สูงที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลจากไฮโดรไลเซตเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด Biofact genomic DNA extraction kit (Biofact Co. Ltd, South Korea) เพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยไพรเมอร์ 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 1541R (5'-AAGGAGGTGATCCAG CCGCA-3') จากนั้นส่งผลผลิต PCR ที่เพิ่มจำนวนได้เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรีย S77-3 และสายพันธุ์ใกล้เคียงมาวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม Mega-11

ผลการวิจัย

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตพลาสติกชีวภาพ

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินบริเวณที่มีแหล่งสารอินทรีย์สมบูรณ์ได้แก่ กองขยะ และ

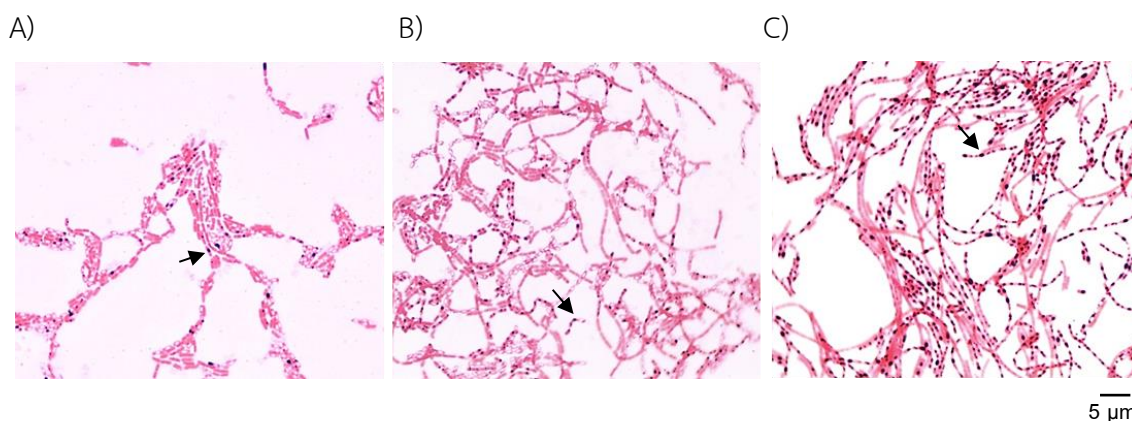
แปลงเกษตร ในพื้นที่จังหวัดนครปฐม พระนครศรีอยุธยา และปทุมธานี จำนวน 10 แห่ง มาทดสอบการผลิตพลาสติกชีวภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และย้อมสีพลาสติกชีวภาพภายในเซลล์ด้วยสารละลายสี Sudan Black B พบเชื้อแบคทีเรียจำนวน 23 ไอโซเลทที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพสะสมไว้ภายในเซลล์ได้ ดังแสดงตัวอย่างการตรวจพบการสะสมพลาสติกชีวภาพในเซลล์แบคทีเรียดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ตัวอย่างแบคทีเรียที่มีการสร้างและสะสมพลาสติกชีวภาพพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตไว้ภายในเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 A) ไอโซเลท S1-2 B) ไอโซเลท S2-1 C) ไอโซเลท S77-3 (ลูกศรชี้ตัวอย่างส่วนอนุภาคพลาสติกที่ติดสีย้อม Sudan Black B)

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลจากไฮโดรไลเซตขานอ้อยผลิตพลาสติกชีวภาพ

จากการนำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นว่าสามารถผลิตพลาสติกชีวภาพได้บนอาหาร NA ที่เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 จำนวน 23 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrogen-deficient medium agar ที่มีน้ำตาลจากไฮโดรไลเซตขานอ้อยร้อยละ 1.5 เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลจากไฮโดรไลเซตขานอ้อยผลิตพลาสติกชีวภาพได้จำนวน 10 ไอโซเลท โดยเชื้อที่มีการสะสมอนุภาคพลาสติกชีวภาพได้สูงที่สุดโดยพิจารณาจากขนาดของอนุภาคพลาสติกภายในเซลล์คือเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S77-3 ดังแสดงตัวอย่างผลการวิเคราะห์การสะสมพลาสติกชีวภาพภายในเซลล์โดยการย้อมด้วยสี Sudan Black B ในภาพที่ 2



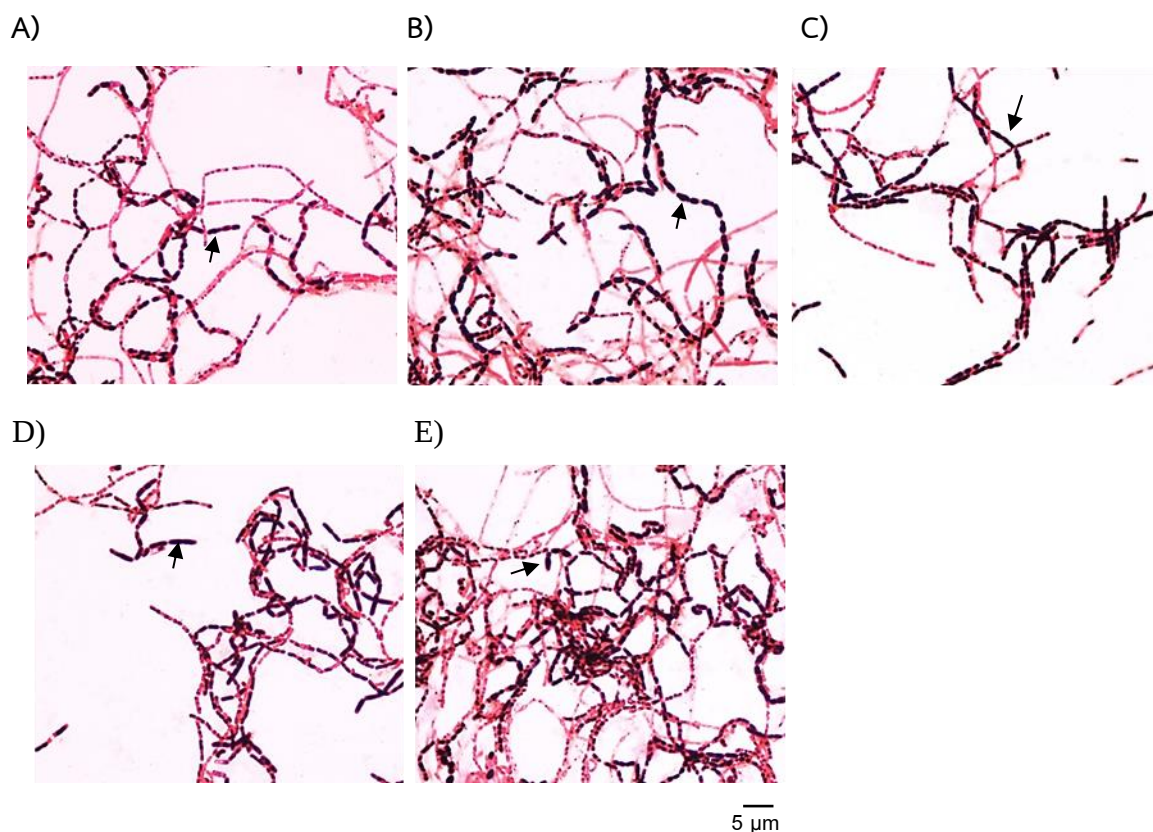
ภาพที่ 2 ตัวอย่างแบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลจากไฮโดรไลเซชันของโปรตีนพืชผลิตพลาสติกชีวภาพสะสมไว้ในเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrogen-deficient medium agar ที่มีน้ำตาลจากไฮโดรไลเซชันของโปรตีนพืชร้อยละ 1.5 A) ไอโซเลต S2-1 B) ไอโซเลต S19-4 C) ไอโซเลต S77-3 (ลูกศรชี้ตัวอย่างส่วนอนุภาคพลาสติกที่ติดสีย้อม Sudan Black B)

3. การศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลจากไฮโดรไลเซชันต่อการสร้างพลาสติกชีวภาพ

จากการนำเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต S77-3 ที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพได้สูงที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrogen-deficient medium agar มาวิเคราะห์การสร้างพลาสติกชีวภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrogen-deficient medium broth ที่มีน้ำตาลจากไฮโดรไลเซชันความเข้มข้นร้อยละ 0.25 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อแบคทีเรีย S77-3 สามารถสร้างและสะสมพลาสติกชีวภาพภายในเซลล์ได้สูงที่สุดเมื่อใช้น้ำตาลจากไฮโดรไลเซชันของโปรตีนพืชที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 เป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 1) โดยวิเคราะห์ปริมาณพลาสติกชีวภาพได้น้ำหนัก 1.68 ± 0.03 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 62.80 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยผลจากการย้อมสีเซลล์ด้วยสีย้อม Sudan Black B พบการสะสมพลาสติกภายในเซลล์ที่เลี้ยงโดยใช้น้ำตาลจากไฮโดรไลเซชันของโปรตีนพืชที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 เป็นแหล่งคาร์บอนสูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่น (ภาพที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ในเชิงปริมาณ

ตารางที่ 1 ปริมาณพลาสติกชีวภาพที่ผลิตได้โดยเชื้อแบคทีเรีย S77-3 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลจากไฮโดรไลเซชันของโปรตีนพืชความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

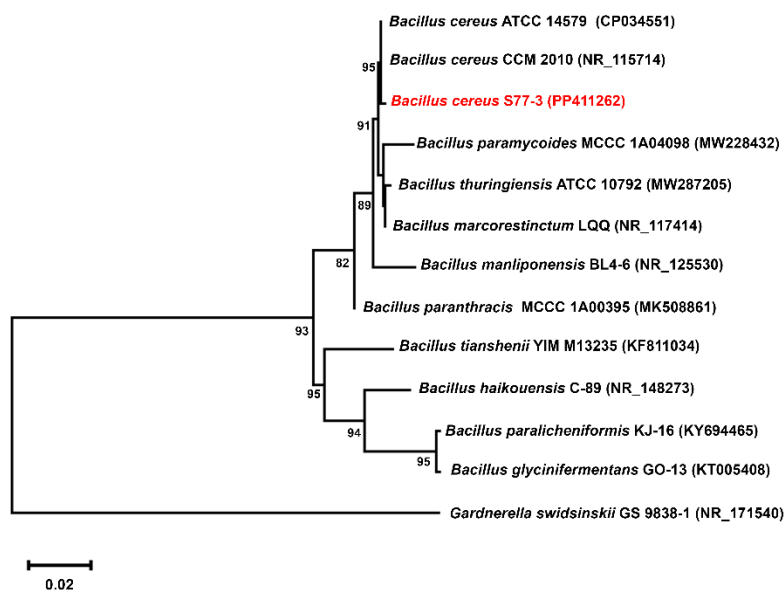
ความเข้มข้นไฮโดรไลเซชัน	ปริมาณพลาสติกที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ร้อยละของการผลิต
0.25	0.69 ± 0.02	2.69 ± 0.14	25.76
0.5	1.04 ± 0.01	2.54 ± 0.02	40.93
1.0	1.29 ± 0.02	4.22 ± 0.01	30.50
1.5	1.68 ± 0.03	2.68 ± 0.02	62.80
2.0	1.53 ± 0.02	2.52 ± 0.01	60.89



ภาพที่ 3 การผลิตและสะสมพลาสมิกชีวภาพโดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S77-3 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลจากไฮโดรไลเซตชานอ้อยความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน A) น้ำตาลร้อยละ 0.25 B) น้ำตาลร้อยละ 0.50 C) น้ำตาลร้อยละ 1.0 D) น้ำตาลร้อยละ 1.5 E) น้ำตาลร้อยละ 2.0 (ลูกศรชี้ตัวอย่างส่วนอนุภาคพลาสมิกที่ติดสีย้อม Sudan Black B)

4. การจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S77-3

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท S77-3 ที่ได้ฝากลำดับนิวคลีโอไทด์ไว้บนฐานข้อมูล NCBI (Accession number : PP411262) พบว่ามีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* ATCC 14579 (Accession number: CP034551.1) มากที่สุด โดยมีค่าความเหมือนของนิวคลีโอไทด์ (Sequence identity) ที่ร้อยละ 99 และผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียไอโซเลท S77-3 กับแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียงในจินัสบาซิลัสให้ผลดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 77-3 และสายพันธุ์ใกล้เคียง สร้างแผนภูมิโดยวิธี Neighbor-Joining ที่ค่า bootstrap 1000 ด้วยโปรแกรม Mega 11 (Tamura et al., 2021)

สรุปและอภิปรายผล

พลาสติกชีวภาพเป็นหนึ่งในวิธีทางเลือกเพื่อช่วยลดปัญหาขยะพลาสติกย่อยสลายได้ยากและมีการใช้งานเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่วัสดุที่จะมาทดแทนพลาสติกที่ใช้อยู่เดิมได้นั้นต้องมีคุณสมบัติในด้านต่าง ๆ ไม่ด้อยไปกว่าเดิม เช่น ราคา ปริมาณ คุณสมบัติทางเคมีด้านต่าง ๆ เช่น ความยืดหยุ่น เป็นต้น สำหรับพลาสติกชีวภาพพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตนั้นหนึ่งในข้อจำกัดเพื่อการใช้ทดแทนพลาสติกแบบเดิมคือต้นทุนการผลิตที่ยังสูงอยู่ จึงมีความพยายามศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่สามารถลดต้นทุนการผลิตได้ เช่น ศึกษาวัตถุดิบที่มีราคาถูกหรือเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการต่าง ๆ โดยสามารถจัดกลุ่มของวัตถุดิบราคาถูกที่มีการศึกษาเพื่อผลิตพลาสติกชีวภาพพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต ดังนี้ วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น วัสดุกลีโนเซลลูโลส กากน้ำตาล วัสดุเหลือทิ้งทางอาหาร เช่น เศษผัก เศษผลไม้ ของเสียในอุตสาหกรรม น้ำทิ้งอุตสาหกรรม เป็นต้น (Akhlaq et al., 2023) โดยวัสดุกลีโนเซลลูโลส เช่น ชานอ้อย ฟางข้าว เป็นที่น่าสนใจในการใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติกชีวภาพภายในประเทศ เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีปริมาณของวัสดุเหลือทิ้งด้านการเกษตรปริมาณมหาศาล นอกจากแหล่งวัตถุดิบราคาถูกแล้วอีกหนึ่งในปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณพลาสติกที่ผลิตได้คือสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถใช้น้ำตาลและทนต่อสารพิษต่าง ๆ ที่เป็นผลพลอยได้จากการเตรียมไฮโดรไลเซตได้

ผลจากการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตพลาสติกชีวภาพพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตในเบื้องต้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 นั้นพบแบคทีเรียที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพจำนวน 23 ไอโซเลท



แต่เมื่อทำการคัดเลือกเชื้อดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไฮโดรไลเซชันอ้อยเป็นวัตถุดิบพบเชื้อที่สามารถสร้างพลาสติกชีวภาพได้ลดลงเป็น 10 ไอโซเลท ทั้งนี้อาจเนื่องจากองค์ประกอบของไฮโดรไลเซชันที่มีสารพิษ เช่น furfural (Thammasittirong et al., 2017) ที่ปนมาจึงอาจเป็นพิษต่อเซลล์ โดยเชื้อแบคทีเรียบางไอโซเลทอาจไม่สามารถทนต่อสารพิษได้ หรือเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญดังจะพบได้จากการสร้างสปอร์ที่เพิ่มสูงขึ้นในเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S2-1 และ S19-4 ในขณะที่ไอโซเลทที่ S77-3 ยังสามารถผลิตและสะสมพลาสติกชีวภาพได้สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเซชัน พบการสร้างสปอร์น้อยกว่า แสดงถึงความสามารถในการทนต่อสารพิษที่พบในไฮโดรไลเซชันได้ดีกว่า และจากการศึกษาความเข้มข้นไฮโดรไลเซชันอ้อยที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานของเชื้อ S77-3 พบว่าที่ทุกความเข้มข้นน้ำตาลจากไฮโดรไลเซชันอ้อยเชื้อ S77-3 สามารถผลิตพลาสติกสะสมไว้ภายในเซลล์ได้ แต่ขนาดของอนุภาคพลาสติกชีวภาพภายในเซลล์ค่อนข้างใหญ่เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่น้ำตาลจากไฮโดรไลเซชันอ้อยความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ขึ้นไป

จากการจัดจำแนกสายพันธุ์โดยวิธีทางอนุชีววิทยาของแบคทีเรียไอโซเลท S77-3 ที่พบว่าไอโซเลท S77-3 เป็นแบคทีเรีย *B. cereus* สอดคล้องกับงานวิจัยที่รายงานถึงเชื้อที่สามารถสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยใช้ไฮโดรไลเซชันจากอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนใหญ่เป็นเชื้อในجنัส *Bacillus* หรือجنัสใกล้เคียง เช่น Saratale et al. (2021) รายงานถึงเชื้อแบคทีเรีย *Lysinibacillus* sp. ที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบ โดยผลิตได้ 5.31 กรัมต่อลิตร ในสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสม Adamu & Bukar. (2022) รายงานถึงการแยกเชื้อ *Bacillus velezensis* จากตัวอย่างดินและพบว่าเชื้อสามารถสร้างพลาสติกชีวภาพพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบ โดยผลิตพลาสติกได้สูงสุด 0.737 กรัมต่อลิตรที่ความเข้มข้นไฮโดรไลเซชันร้อยละ 3.0 แม้ว่าการผลิตพลาสติกชีวภาพพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยเชื้อ *B. cereus* S77-3 ยังอยู่ในระดับไม่สูงมาก เนื่องจากยังคงต้องศึกษาถึงปัจจัยอื่น ๆ ให้เหมาะสมเพิ่มเติม เช่น ผลของแหล่งไนโตรเจน พีเอช หรือระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการทดลองในครั้งนี้มุ่งเน้นเพื่อคัดกรองเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพลาสติกชีวภาพพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรคืออ้อยที่จะส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตพลาสติกชีวภาพลดลง สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* S77-3 เพื่อให้ผลิตพลาสติกชีวภาพได้ปริมาณสูงยังคงเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องศึกษาต่อไป



เอกสารอ้างอิง

- กองบรรณาธิการ Green Network. (2563). ทั่วโลกกำจัดขยะ (พลาสติก) แก้ปัญหาสิ่งแวดล้อม ร่วมกันอนุรักษ์พลังงาน. สืบค้นเมื่อ 7 มีนาคม 2567 จาก
<https://www.greennetworkthailand.com/กำจัดขยะพลาสติก>
- ณิชา บุณยสิงห์. (2562). “ขยะพลาสติก” ปัญหาระดับโลกที่ต้องเร่งจัดการ. สืบค้นเมื่อ 7 มีนาคม 2567 จาก
https://www.parliament.go.th/ewtadmin/ewt/parliament_parcy/ewt_dl_link.php?id=58603&filename=index
- สุภาวดี ผลประเสริฐ. (2557). การปรับสภาพวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสสำหรับการผลิตเอทานอล. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 22(5), 641-649.
- Adamu, K. S., & Bukar, A. (2022). Production of biodegradable plastic by *Bacillus* sp. using sugarcane baggase. Bayero Journal of Pure and Applied Sciences, 13(1): 180-186.
- Akhlaq, S., Singh, D., Mittal, N., Srivastava, G., Siddiqui, S., Faridi, S. A., & Siddiqui, M. H. (2023). Polyhydroxybutyrate biosynthesis from different waste materials, degradation, and analytic methods: a short review. Polymer Bulletin, 80(6), 5965-5997.
- Anderson, A. J., & Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiological Reviews, 54(4), 450-472.
- Hassan, S., Ngo, T., & Ball, A. S. (2024). Valorisation of sugarcane bagasse for the sustainable production of polyhydroxyalkanoates. Sustainability, 16, 2200.
- Hidayat, Y. N., Alamsyah, R., Roslan, A. M., Hermansyah, H., & Gozan, M. (2019). Production of polyhydroxybutyrate from oil palm empty fruit bunch (OPEFB) hydrolysates by *Bacillus cereus* suaeda B-001. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 18, 101019.
- Getachew, A., & Woldesenbet, F. (2016). Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material. BMC Res Notes, 9(1), 509.
- Jeevitha, W., Premila, J., Mahitha, S., & Mahalakshmi, M. (2023). Analysis, optimization and molecular characterization of PHB positive bacterial from agricultural soil sample. Journal of Advanced Zoology, 44.



- Kadriye İnan, B., Can, K., & Belduz, A. O. (2023). Isolation and screening of polyhydroxybutyrate (PHB) producing bacteria from soils. *Biology Bulletin*, 50, 319-328.
- Luengo, J. M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G., & Olivera, E. a. R. (2003). Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 251-260.
- Mueller, R. J. (2006). Biological degradation of synthetic polyesters—Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. *Process Biochemistry*, 41(10), 2124-2128.
- Ohtake, Y., Kobayashi, T., Asabe, H., & Murakami, N. (1998). Studies on biodegradation of LDPE — observation of LDPE films scattered in agricultural fields or in garden soil. *Polymer Degradation and Stability*, 60(1), 79-84.
- Saratale, R. G., Cho, S. K., Saratale, G. D., Ghodake, G. S., Bharagava, R. N., Kim, D. S., Nair, S., & Shin, H. S. (2021). Efficient bioconversion of sugarcane bagasse into polyhydroxybutyrate (PHB) by *Lysinibacillus* sp. and its characterization. *Bioresource Technology*, 324, 124673.
- Tamura K., Stecher G., & Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Thammasittirong, A., Saechow, S., & Thammasittirong, S. N. R. (2017). Efficient polyhydroxybutyrate production from *Bacillus thuringiensis* using sugarcane juice substrate. *Turkish Journal of Biology*, 41(6), 992-1002.
- Thammasittirong, S. N., Chatwachirawong, P., Chamduang, T., & Thammasittirong, A., (2017) Evaluation of ethanol production from sugar and lignocellulosic part of energy cane. *Industrial Crops & Products*, 108, 598-603.