การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHAs) จาก *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3

Optimization of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Production from *Bacillus cereus* Strain PE3

พิชาภัค ศรียาภัย[1*] ทายาท ศรียาภัย[2] และ สิริธร สโมสร[3]

Pichapak Sriyapai[1*], Thayat Sriyapai[2] and Siritron Samosorn[3]

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[2]คณะวัฒนธรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[3]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[1]Department of Biology, Faculty of Sciences, Srinakharinwirot University

[2]Faculty of Environmental Culture and Ecotourism, Srinakharinwirot University

[3]Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Srinakharinwirot University

Received : 11 August 2016

Accepted : 8 November 2016

Published online : 18 November 2016

บทคัดย่อ

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHAs) เป็นเทอร์โมพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ แบคทีเรียหลายสปีชีส์สะสมแกรนูลของ PHAs เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานสำรองไว้ภายในเซลล์ การศึกษานี้ได้รายงานถึงการหาสภาวะที่เหมาะสม และการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) และพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) (PHBV) จาก *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ที่แยกได้จากตัวอย่างดินในประเทศไทย ในงานวิจัยนี้ได้ทดลองถึงผลของชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ ระยะเวลาการบ่ม แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และค่าความเป็นกรดด่าง (พีเอช) สำหรับการผลิต PHAs โดยสายพันธุ์ PE3 ผลิต PHB ที่มีความเข้มข้นสูงสุด 3.1 กรัมต่อลิตร และปริมาณ PHB คิดเป็น 79.5% (3.9 กรัมต่อลิตรของน้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Nitrogen deficient medium ที่ประกอบด้วย 3% (w/v) glucose เป็นแหล่งคาร์บอน และ 0.25% (w/v) peptone และ 0.25% (w/v) yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับค่าพีเอชเป็น 7 อุณหภูมิบ่ม 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ผลของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของการผลิต PHBV เมื่อเลี้ยงใน 5% (v/v) กากน้ำตาล และ 0.5% (w/v) กรดโพรพิโอนิก PHB และPHBV ถูกวิเคราะห์ด้วย fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) และ nuclear magnetic resonance (NMR) การสะสมแกรนูล PHB ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบ 2-7 แกรนูลในเซลล์

คำสำคัญ : *Bacillus cereus* พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโคไฮดรอกซีวาลีเรต (PHBV) พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHAs)

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

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biodegradable, environmentally friendly and biocompatible thermoplastics. Various bacterial species accumulate PHAs granules as a carbon and energy reserve inside their cells. The present study aimed to optimize culture conditions for the production of polyhydroxybutyrate (PHB) and poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) (PHBV) from *Bacillus cereus* strain PE3 previously isolated from soil sample in Thailand. Effect of medium, incubation time, carbon sources, nitrogen sources and initial pH on PHAs production were investigated. Strain PE3 showed maximum PHB concentration of 3.1 g/L and PHAs content of 79.5% (3.9 g/L of cell dry weight) when cultured in Nitrogen deficient medium with 3% (w/v) glucose as a carbon source and 0.25% (w/v) peptone and 0.25% (w/v) yeast extract as nitrogen sources at pH 7, 37°C and 48 hours cultivation. Effect of carbon source and concentration of PHBV production were obtained with 5% (v/v) molasses and 0.5% (w/v) propionic acid. PHB and PHBV were analyzed using fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and nuclear magnetic resonance (NMR). The accumulate PHB granule was detected by transmission electron microscopy (TEM) showed 2-7 granules in cell.

Keywords : *Bacillus cereus*, polyhydroxybutyrate (PHB), polyhydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalerates (PHBV), polyhydroxyalkanoates (PHAs)

บทนำ

การใช้พลาสติกที่ผลิตจากปิโตรเคมีมีปริมาณมากขึ้นทุกวัน ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมากเนื่องจากย่อยสลายได้ยากในธรรมชาติ หลายๆ ประเทศตื่นตัวในการหาวัสดุอื่นๆ เพื่อผลิตและนำมาใช้ทดแทน ซึ่งพลาสติกชีวภาพชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ คือ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalcanoates หรือ PHAs) ซึ่งเป็นอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ของ hydroxyalkanoates (HA) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ β-hydroxyacyl พบสะสมอยู่ในแบคทีเรียหลายชนิดมีลักษณะเป็นแกรนูล (granules) สีขาวสะสมอยู่ในไซโตพลาสซึมของแบคทีเรียที่เป็นแหล่งคาร์บอนภายในเซลล์และแหล่งพลังงาน แบคทีเรียเจริญภายใต้สภาวะที่ถูกจำกัดปริมาณสารอาหาร เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และออกซิเจน แต่มีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอ เช่น กลูโคส และซูโครส (Matsusaki *et al.,* 1998) PHAs แบ่งออกเป็น 3 ชนิดตามความยาวของสายอะตอมคาร์บอน และ side chain (*R* group) ในหน่วยมอนอเมอร์ของสายพอลิเมอร์ ได้แก่ PHAs สายสั้นที่มีจำนวนอะตอมคาร์บอน 3-5 อะตอม (short-chain length PHA, scl-PHA) PHAs สายปานกลางที่มีจำนวนอะตอมคาร์บอน 6-14 อะตอม (medium-chain length PHA, mcl-PHA) และ PHAs สายยาวที่มีจำนวนอะตอมคาร์บอนตั้งแต่ 15 อะตอมขึ้นไป (long-chain length PHA, lcl-PHA) (Keshavarz & Roy, 2010) แต่ถ้า PHAs แบ่งตามลักษณะของพอลิเมอร์ แบ่งได้ 2 ชนิด ได้แก่ homopolymer และ heteropolymer (Anderson & Dawes, 1990) ปัจจัยที่มีผลทำให้ PHAs มีคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีแตกต่างกัน เช่น ชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิต (แกรมลบ และแกรมบวก) ส่วนประกอบของสารอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ สภาวะของการเลี้ยงเชื้อ วิธีเลี้ยงเชื้อ และการเก็บเกี่ยวผลผลิต (Keshavarz & Roy, 2010) การผลิต PHAs สามารถสะสมได้ในพืช เช่น *Arabidopsis thaliana* (Mittendorf *et al.,* 1998) และ*Brassica napus* (Hourniel *et al.,* 1999) และในจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียซึ่งมีมากกว่า

300 สปีชีส์ เช่น *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. และ *Methylobacterium* sp. (Suriyamongkol *et al.,* 2007; Steinbüchel & Schlegel, 1991) แต่มีบางชนิด เช่น *Alcaligenes eutrophus*, *A. latus* และ *A. vinelandii* UWD ที่สะสม PHAs ได้โดยไม่มีการจำกัดปริมาณสารอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ (Keshavarz & Roy, 2010; Ojumu *et al.,* 2004)

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (polyhydroxybutyrate หรือ PHB) เป็น homopolymer ของ 3-hydroxybutyrate (HB) จัดอยู่ในกลุ่ม PHAs ค้นพบเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1926 โดย Lamoigne (Lemoigne, 1926) มีคุณสมบัติคล้ายกับ polypropylene (PP) แต่มีเสถียรทางความร้อนต่ำ และมีความเปราะบาง ต่อมาในปี ค.ศ. 1983 บริษัท Imperial Chemical Industries (ICI) ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์ภายใต้ชื่อทางการค้า BIOPOL™ โดยผลิตโคพอลิเมอร์ที่อยู่ในกลุ่ม PHAs ซึ่งเป็นเทอร์โมพลาสติกที่เกิดจากการรวมตัวกันของมอนอเมอร์ 3-hydroxybutyrate (HB) และ3-hydroxyvalerate (HV) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ (ester bone) คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) (poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) หรือ PHBV) ที่มีคุณสมบัติไม่เปราะแตกง่าย และมีความยืดหยุ่นสูง (Lee, 1996) และพบว่าหน่วยเปอร์เซ็นต์โมล (% mol) HV สูงมีผลต่อความยืดหยุ่น ความทนทานของพลาสติก และการขึ้นรูปได้ง่าย (Nurbas & Kutsal, 2004)

PHB และPHBV สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพโดยอาศัยเอนไซม์จากจุลินทรีย์จึงเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ เช่น ด้านการแพทย์และเภสัช ด้านบรรจุภัณฑ์ ด้านการเกษตร แต่มีข้อจำกัดในการผลิตทางการค้า เนื่องจากมีต้นทุนสูงโดยพบว่าต้องใช้กลูโคส 3 ตันเป็นสับสเตรทของการผลิตพลาสติก 1 ตัน (Collins, 1987) ดังนั้นสับสเตรทที่มีราคาถูก เช่น เมทานอล เอทานอล กลีเซอรอล ข้าวฟ่างหวาน และกากน้ำตาล จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่นำมาลดต้นทุนการผลิต Gouda *et al.* (2001) ใช้น้ำแช่ข้าวโพด และกากน้ำตาลเป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนที่มีส่วนประกอบของวิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ มาเลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* เพื่อผลิต PHB จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการแยกเชื้อ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ในห้องวิจัย และพบว่ามีศักยภาพในการผลิต PHAs ได้ดี (Joraleerut *et al.,* 2014) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการผลิตระดับ large scale ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

Bacillus cereus สายพันธุ์ PE3 แยกได้จากดินป่าชายเลนในจังหวัดสตูล มีการศึกษาทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA จากการทดลองก่อนหน้านี้ (Joraleerut *et al.,* 2014) การคัดเลือกเชื้อเพื่อทดสอบการผลิต PHAs เริ่มต้นใช้วิธีการย้อมสี Sudan black B จากนั้นนำเชื้อที่มีการผลิต PHAs ตรวจสอบอีกครั้งเพื่อยืนยันผลการผลิตโดยการย้อมสี Nile blue และ Nile red (Singh & Parmar, 2011; Wang & Bakken,1998) การรักษาเชื้อโดยการเลี้ยงเชื้อบน nutrient agar slant และเททับด้วย 20% (v/v) กลีเซอรอล เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำออกมาใช้ในการทดลองต่อไป

2. การเตรียมเชื้อเริ่มต้น และอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยการนำโคโลนีแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth ที่มีส่วนผสมของ glucose 10 g/L ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 180 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.6-0.8 ถ่ายเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหาร

ที่ใช้ในการผลิต PHAs ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 180 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 เพื่อผลิต PHAs ดัดแปลงสูตรอาหารจาก Gowda & Shivakumar (2013) ซึ่งมีทั้งหมด 5 ชนิดได้แก่ (1) Nutrient broth (NB) ที่ผสม glucose 10 g/L (2) Nitrogen deficient medium ประกอบด้วย glucose 10 g/L, $MgSO_4$ 0.2 g/L, NaCl 0.1 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, peptone 2.5 g/L และ yeast extract 2.5 g/L (3) Nitrogen limit medium ประกอบด้วย glucose 10 g/L, yeast extract 2.5 g/L, KCl 3 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 5 g/L และ defatted soybean dialysate 100 มิลลิลิตร (เตรียมจาก 10 กรัมของ defatted soybean meal ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) (4) Potassium deficient medium ประกอบด้วย glucose 10 g/L, peptone 10 g/L, NaCl 13 g/L และ casein 5 g/L และ (5) Sulfur deficient medium ประกอบด้วย glucose 10 g/L, yeast extract 2.5 g/L, KCl 3 g/L, NH_4Cl 5 g/L

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs

3.1 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ถ่ายเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ Nutrient broth, Nutrient broth ที่มีส่วนผสมของ glucose 10 g/L, Nitrogen deficient medium, Nitrogen limit medium, Potassium deficient medium และ Sulfur deficient medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 rpm เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเก็บเซลล์ วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight, CDW) และสกัด PHAs

3.2 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

นำแบคทีเรียมาศึกษาผลของระยะเวลา โดยการถ่ายเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่ผลิต PHAs สูงสุด ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง โดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 60 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 rpm หลังจากนั้นทำการเก็บเซลล์ วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง และสกัด PHAs

3.3 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

ถ่ายเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่ผลิต PHAs สูงสุด ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ glucose, sucrose, xylose, arabinose, fructose, lactose, กากน้ำตาล (molasses), กลีเซอรอล บริสุทธิ์ (pure glycerol) และกลีซอลรอลดิบ (crude glycerol) ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1-5 % (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 rpm โดยใช้ระยะเวลาที่เชื้อมีการผลิต PHAs สูงสุด หลังจากนั้นทำการเก็บเซลล์วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง และสกัด PHAs

กากน้ำตาลได้จากของเหลือทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมในอำเภอ องครักษ์ จังหวัด นครนายก โดยส่งตัวอย่างกากน้ำตาลไปวิเคราะห์ส่วนประกอบที่สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย อำเภอ คลองหลวง จังหวัด ปทุมธานี

3.4 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจน

ถ่ายเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่ผลิต PHAs สูงสุดที่ทราบชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ peptone และ yeast extract, peptone และ$(NH_4)_2SO_4$, peptone และ NH_4Cl, yeast extract และ$(NH_4)_2SO_4$, yeast extract และ NH_4Cl โดยใช้ความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดเท่ากับ 0.25% (w/v)

จากนั้นนำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 rpm โดยใช้ระยะเวลาที่เชื้อมีการผลิต PHAs สูงสุด หลังจากนั้นทำการเก็บเซลล์ วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง และสกัด PHAs

3.5 ผลของค่าความเป็นกรดด่าง

ถ่ายเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่ผลิต PHAs สูงสุด ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ทราบชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และชนิดของแหล่งไนโตรเจน โดยปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 6, 7 และ 8 จากนั้นนำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 rpm โดยใช้ระยะเวลาที่เชื้อมีการผลิต PHAs สูงสุด ทำการเก็บเซลล์ วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง และสกัด PHAs

3.6 การผลิต PHBV จากกากน้ำตาลร่วมกับกรดโพรพิโอนิก

ถ่ายเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่ประกอบด้วย 5% (v/v) กากน้ำตาล, $MgSO_4$ 0.2 g/L, NaCl 0.1 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, peptone 2.5 g/L และ yeast extract 2.5 g/L เติมกรดโพรพิโอนิกที่มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 และ 1% (w/v) โดยเตรียมปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 rpm หลังจากนั้นทำการเก็บเซลล์ วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง และสกัด PHBV เพื่อนำไปวิเคราะห์

ทุกการทดลองปริมาณ PHAs คิดจากค่าเฉลี่ยของผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

4. การสกัด PHAs ออกจากเซลล์

ปริมาณ PHAs ทุกการทดลองในการหาสภาวะที่เหมาะสมจะนำมาสกัด PHAs ออกจากเซลล์ด้วยวิธีการที่ดัดแปลงจาก Hahn *et al.* (1994) ภายหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเซลล์ pellet มาผสมในสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำเซลล์ pellet มาล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำเซลล์ pellet ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมคลอโรฟอร์มและ 5% (v/v) โซเดียมไฮโปคลอไรต์ในอัตราส่วน 12.5 มิลลิลิตรต่อ12.5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 180 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที สังเกตเห็นการแยกชั้นของสารละลายแบ่งออกเป็น 3 ชั้น โดยชั้นบนจะเป็นสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ชั้นกลางเป็นส่วนของตะกอนเซลล์ และชั้นล่างเป็นสารละลายคลอโรฟอร์มและ PHAs จากนั้นเก็บส่วนชั้นล่าง เติม 5 เท่าของเมทานอล นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นชั่งน้ำหนัก PHAs ที่ได้เพื่อคำนวณหาปริมาณ ในหน่วยกรัมต่อลิตร (PHAs concentration, g/L) ผลการทดลองที่ได้จากการหาค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์ (CDW, g/L) และปริมาณ PHAs ที่สกัดได้สามารถคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ของ PHAs content (Grothe & Chisti, 2000)

$$\%\text{PHAs content} = \frac{\text{น้ำหนักของ PHAs ที่สกัดได้}}{\text{น้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์แบคทีเรีย}} \times 100$$

5. การวิเคราะห์ PHAs ด้วยวิธี FTIR และ NMR

FTIR ใช้ในการวิเคราะห์ตรวจสอบโครงสร้างของสาร โดยส่งวิเคราะห์ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อยืนยันผลเปรียบเทียบกับสาร PHB และ PHBV (Sigma) มาตรฐาน ซึ่ง PHB ให้ผลของสเปกตรัม C=O ของกลุ่มเอสเทอร์ที่ 1728 cm^{-1} และ -CH group ที่ 1282 cm^{-1} สำหรับ PHBV แสดงเลขคลื่นที่ C=O 1737 cm^{-1} และ –CH ที่ 1303, 1229, 1196 และ 797 cm^{-1} การเตรียมตัวอย่างโดยนำ PHAs ที่สกัดได้มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2-4 ชั่วโมง ชั่งตัวอย่าง 2-3 มิลลิกรัมใส่หลอดแก้วแล้วละลายด้วยสารคลอโรฟอร์ม 500 ไมโครลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FTIR spectrometer รุ่น Perkin Elmer FT-IR spectrum BX.

การวิเคราะห์ NMR ส่งวิเคราะห์ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อยืนยันผลเปรียบเทียบกับ PHB มาตรฐานซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับค่า chemical shifts 5.25 ppm (ส่วนในล้านส่วน) และ PHBV มาตรฐานที่มีค่า chemical shifts 5.17 ppm (ส่วนในล้านส่วน) โดยนำ PHAs ที่สกัดได้มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2-4 ชั่วโมง ชั่งตัวอย่าง 20-70 มิลลิกรัมใส่หลอดแก้วแล้วละลายด้วย $CDCl_3$ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปฉีดวิเคราะห์ในเครื่องรุ่น Bruker AVANCE 300 FT-NMR spectrometer และบันทึก spectrum ที่ช่วงคลื่น 300 MHz และ 75 MHz

6. การสะสม PHAs ในเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เริ่มเตรียมตัวอย่างจากการนำโคโลนีแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลว Nitrogen deficient medium เขี่ยเชื้อมาละลายใน 2 % (v/v) glutaraldehyde แล้วนำสารละลายเซลล์หยดลงบนแผ่นกริด และเคลือบทับด้วย 4 % (v/v) uranyl acetate ทิ้งไว้จนแห้งแล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs

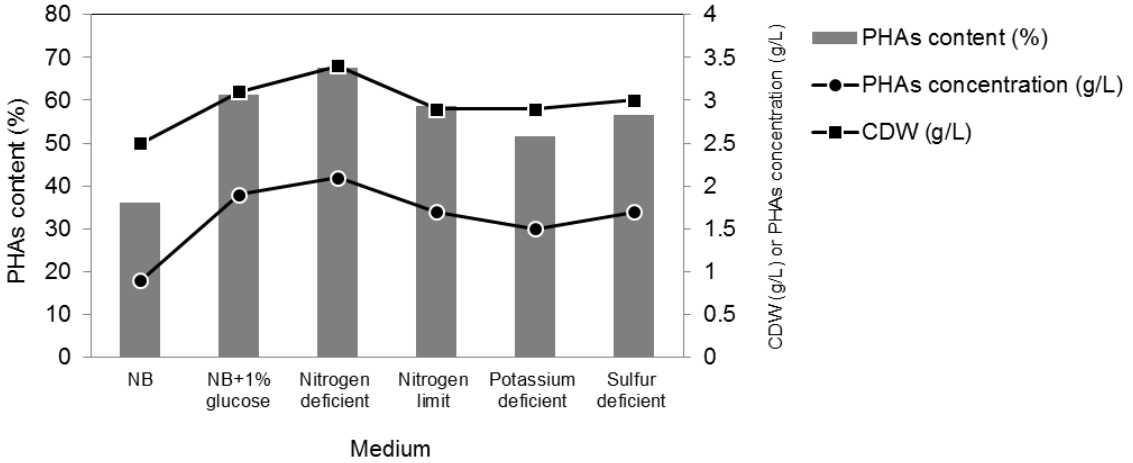
1.1 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผลิต PHAs

การศึกษาการผลิต PHAs จากเชื้อ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ในสูตรอาหารชนิดต่างๆ พบว่า Nitrogen deficient medium เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการสะสม PHAs ของเซลล์ (PHAs content) คิดเป็น 67.7% (2.1 กรัมต่อลิตรของน้ำหนัก PHAs) รองลงมา ได้แก่ Nutrient broth ที่ผสม glucose 10 g/L, Nitrogen limit medium, Sulfur deficient medium และ Potassium deficient medium ผลิต PHAs คิดเป็น 61.26% (1.9 กรัมต่อลิตรของน้ำหนัก PHAs), 58.62% (1.7 กรัมต่อลิตรของน้ำหนัก PHAs), 56.67% (1.7 กรัมต่อลิตรของน้ำหนัก PHAs) และ 51.72% (1.5 กรัมต่อลิตรของน้ำหนัก PHAs) ตามลำดับ Nutrient broth เป็นอาหารที่เชื้อผลิต PHAs ได้น้อยที่สุดคิดเป็น 36% (0.9 กรัมต่อลิตรของน้ำหนัก PHAs) (ภาพที่ 1) เนื่องจากส่วนประกอบของอาหารไม่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งแหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของเชื้อในการผลิต PHB ที่ต้องมีปริมาณมากเกินพอ (Linko *et al.,* 1993) กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต (Kim *et al.,* 1994) เนื่องจากเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่แบคทีเรียสามารถดูดซึม และนำไปใช้ในกระบวนการเมทาบอลิซึมได้ง่าย กระบวนการผลิต PHAs ในสภาวะที่จำกัดปริมาณสารอาหารแต่แหล่งคาร์บอนต้องมีปริมาณมากเกินพอจึงจะทำให้กลูโคสถูกเปลี่ยนเป็น acetyl-CoA จากนั้น acetyl-CoA ถูกเปลี่ยนเป็น PHAs โดยอาศัยเอนไซม์ 3 ชนิดได้แก่ β- ketothiolase,

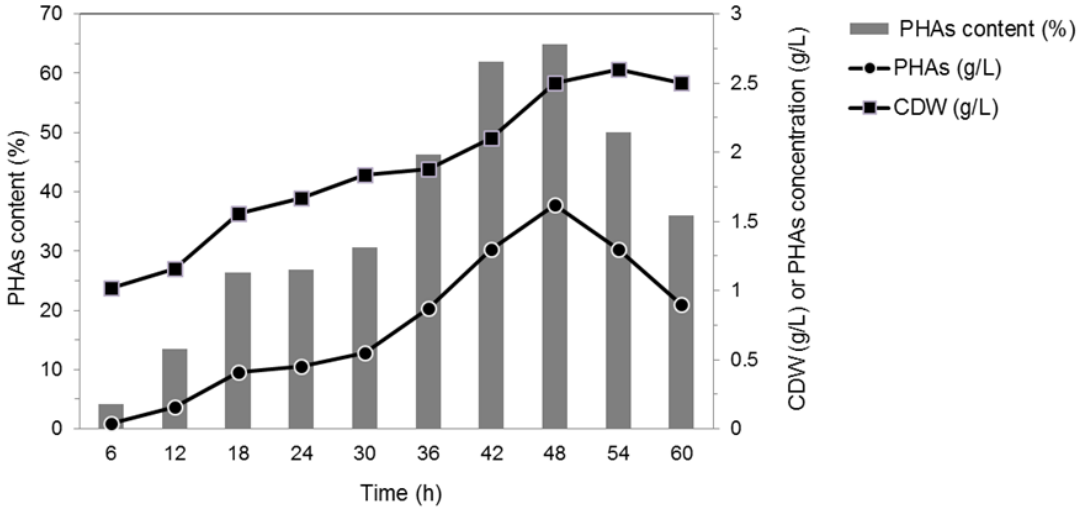
NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase และ PHA synthase แต่ถ้าแบคทีเรียถูกเลี้ยงในอาหารที่มีสารอาหารสมดุล acetyl-CoA จะถูกเปลี่ยนเป็นพลังงานและสารชีวมวลจึงไม่สามารถผลิต PHAs ได้ภายในเซลล์ (Aldor & Keasling, 2003) Gowda & Shivakumar (2013) ได้ศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิต PHB จากเชื้อ *Bacillus thuringiensis* IAM 12077 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำกัดปริมาณสารอาหารโพแทสเซียม ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และฟอสฟอรัสนั้นส่วนใหญ่จะต้องมีกลูโคสเป็นส่วนประกอบ 10 กรัมต่อลิตร โดยอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrogen deficient medium เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตซึ่งผลิต PHA ได้ 4 กรัมต่อลิตรเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และพบว่า Sulfur deficient medium, Potassium deficient medium และ Phosphate deficient medium สามารถผลิต PHB ได้เช่นกัน ดังนั้นการขาดสารอาหารจึงมีผลต่อการผลิต PHB Valappli *et al.* (2008) ได้เลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* SPV ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันโดยการจำกัดปริมาณโพแทสเซียม ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และฟอสเฟต และพบว่า Nitrogen deficient medium เป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมทั้งในการผลิต PHA และการเจริญของเซลล์

1.2 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิต PHAs พบว่าที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมงเชื้อผลิต PHAs ได้สูงสุด คิดเป็น 64.8% (1.6 กรัมต่อลิตรของน้ำหนัก PHAs) (ภาพที่ 2) และเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นการผลิต PHAs ลดลงเนื่องจากน้ำหนักเซลล์แห้งที่วัดได้มีค่าน้อยลงภายหลัง 48 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Babruwad *et al.* (2015) ที่ได้รายงานว่าความเข้มข้นของ PHB ลดลงหลังจาก 48 ชั่วโมงเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* PW3A และการผลิต PHAs ลดลงหลังจาก 72 ชั่วโมง อาจเนื่องมาจากเชื้อเริ่มขาดสารอาหาร มีการสะสมพวก metabolites ที่มีผลกระทบต่อการผลิต PHAs โดยทั่วไปแบคทีเรียมีการสะสม PHAs และปริมาณเซลล์จะสูงสุดในช่วงเริ่มต้นระยะ stationary phase การลดการสะสม PHB เนื่องจากเกิดกระบวนการ PHAs metabolism



ภาพที่ 1 การศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิต PHAs จากเชื้อ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 โดยเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ PE3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB), Nutrient broth ที่ผสม glucose 10 g/L (NB+1% glucose), Nitrogen deficient medium, Nitrogen limit medium, Potassium deficient medium และ Sulfur deficient medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 2 การศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร Nitrogen deficient medium นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 rpm เป็นเวลา 60 ชั่วโมง (h) เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง

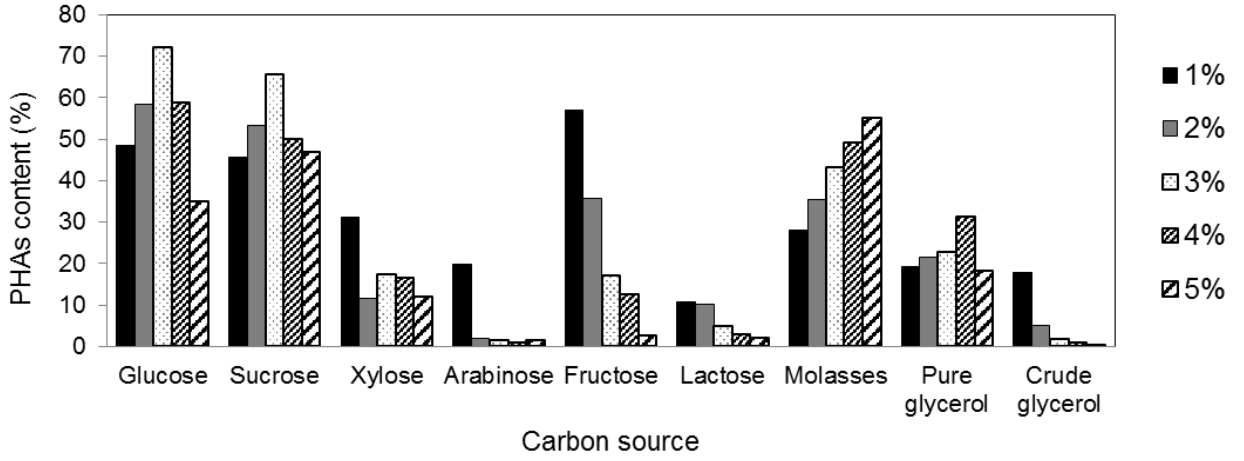
1.3 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ผลิต PHAs ได้ดีที่สุด คือ การเลี้ยงเชื้อในอาหาร Nitrogen deficient medium ที่ประกอบด้วย 3% (w/v) glucose เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง มีการสะสม PHAs เท่ากับ 72.1 % (2.45 กรัมต่อลิตรของน้ำหนัก PHAs) (ภาพที่ 3) เนื่องจากเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เชื้อนำไปใช้ได้ง่ายในการเจริญและผลิต PHAs (Khanna & Srivastava, 2005) รองลงมา 3% (w/v) sucrose มีการะสม PHAs เท่ากับ 68.7% (2.2 กรัมต่อลิตรของน้ำหนัก PHAs) นอกจากนี้ยังพบว่า 5% กากน้ำตาลมีการสะสม PHAs เท่ากับ 55.2% (1.55 กรัมต่อลิตรของน้ำหนัก PHAs) เมื่อวิเคราะห์สารประกอบของกากน้ำตาลที่นำมาวิจัยพบว่าประกอบด้วย 18.93% (w/v) sucrose, 7.88 % (w/v) glucose, 10.36% (w/v) fructose, 0.54%(w/v) สารประกอบไนโตรเจน และ 0.33% (w/v) น้ำตาลรีดิวซ์ ดังนั้นกากน้ำตาลจึงเป็นแหล่งอาหารที่เชื้อสามารถสะสม PHAs ได้เนื่องจากมีส่วนประกอบของน้ำตาลหลายชนิด และยังประกอบด้วย trace elements และวิตามินที่สำคัญ เช่น thiamine riboflavin pyridoxine และ niacinamide (Gouda *et al.,* 2001) ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนก็เป็นปัจจัยสำคัญในการสะสมพลาสติก Page (1992) รายงานว่าการผลิต 55.2% PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อใช้ 5% (v/v) กากน้ำตาลเลี้ยงเชื้อ *Azotobacter vinelandii* UWD และผลิต 32% PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงใน 3% (v/v) กากน้ำตาล ดังนั้นกากน้ำตาลจึงเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลกลูโคสจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำมาใช้ในการผลิต (Page, 1992) Kulpreecha *et al.* (2009) ผลิต PHB จาก *Bacillus megaterium* ด้วยวิธี fed-batch โดยใช้กากน้ำตาลและยูเรียเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ แหล่งกลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อผลิต PHAs ได้เช่นกันเนื่องจากเชื้อจะนำไปใช้ได้โดยผ่านกระบวนการ β-oxidation มีเอนไซม์ enoyl-CoA hydratase เข้ามาเปลี่ยนกรดไขมันเป็น 3-hydroxyacyl-CoA เกิดกระบวนพอลิเมอร์ไรเซชันโดยเอนไซม์ PHA polymerase ได้ PHAs เป็นผลิตภัณฑ์ (Aldor & Keaslingy, 2003) ส่วนกลีเซอรอลดิบให้ผลการผลิตต่ำลงเนื่องจากมีการเจริญของเชื้อน้อยแสดงว่า

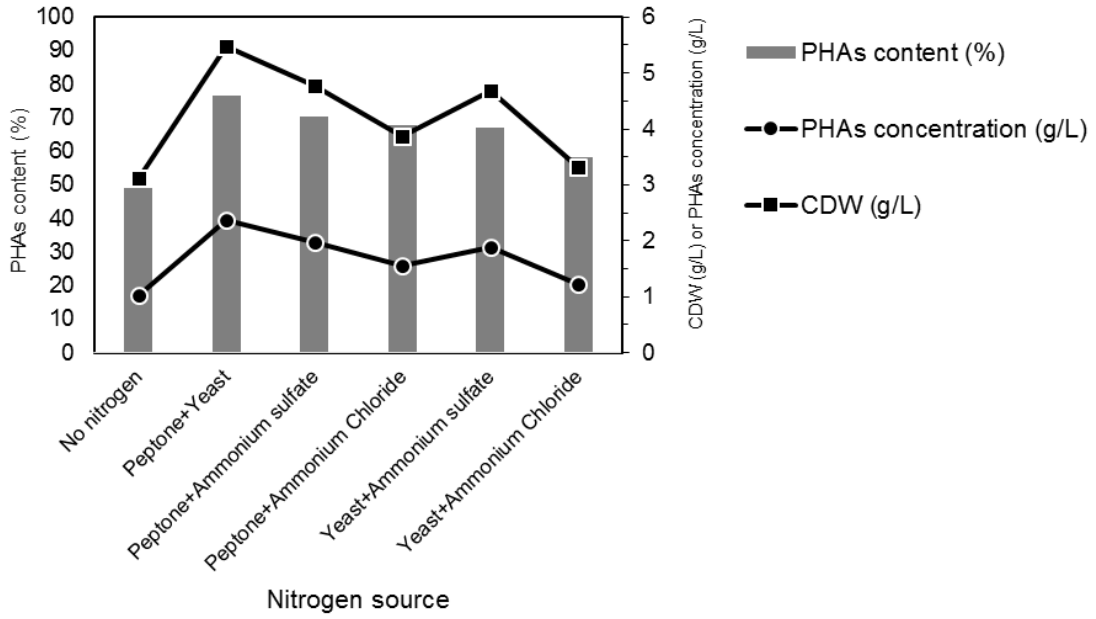
กลีเซอรอลดิบอาจมีสารอื่นๆ เจือปนอยู่มากจึงไปยับยั้งการเจริญของเชื้อ สำหรับน้ำตาลฟรุกโตสเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนพบว่าการผลิต PHAs น้อยลงเนื่องจากฟรุกโตสเมื่อเข้าสู่ขั้นตอนไกลโคไลซิสจะมีการผลิตกรดออกมาปริมาณมากกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ ส่งผลให้ไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตสมีผลในการยับยั้งการเจริญของ *Ralstonia eutropha* และไปเพิ่มแรงดันออสโมซิสส่งผลให้เกิดความไม่สมดุลกันระหว่างกระบวนการไกลโคไลซิสและกระบวนการออกซิเดชันภายในเซลล์ และเมื่อแหล่งคาร์บอนถูกการเผาผลาญมากเกินความจำเป็นจะทำให้เกิดกรดอะซิเตทซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Tabanden & Vasheghani-Farahani, 2002)

1.4 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจน

การศึกษาชนิดแหล่งไนโตรเจนในการผลิต PHAs พบว่าสายพันธุ์ PE3 เมื่อใช้ peptone และ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนมีการผลิต PHAs สูงสุดเท่ากับ 76.4% (2.4 กรัมต่อลิตรของน้ำหนัก PHAs) ซึ่งเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่ผลิต PHAs หลังจาก 48 ชั่วโมง ผลของแหล่งอินทรีย์โนโตรเจน เช่น peptone, beef extract, yeast extract และ tryptone มีผลในการผลิต PHB จากเชื้อ *Bacillus cereus* PW3A และพบว่า peptone และ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการผลิต PHB (ภาพที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบกับ tryptone (Babruwad *et al.,* 2015) Page (1992) ศึกษาการผลิต PHB โดยใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ ดังนี้ fish peptone, protease peptone, yeast extract, casitone, phytone และ tryptone ซึ่งช่วยในการผลิต PHB ได้ดีจากเชื้อ *Azotobacter vinelandii* UWD (Page, 1992) ซึ่งผลการทดลองเหมือนกับการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis*, *Anaerobiospirillum succiniproducens* และ *Phafia rhodozyma* ที่เลี้ยงใน yeast extract ชนิดเดียว และ เลี้ยงใน yeast extract และ peptone (Lee & Choi, 1999)



ภาพที่ 3 การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ในอาหาร Nitrogen deficient medium ที่มีแหล่งคาร์บอน และปริมาณความเข้มข้นที่แตกต่างกัน แหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้แก่ glucose, sucrose, xylose, arabinose, fructose, lactose, molasses, pure glycerol และ crude glycerol ซึ่งมีความเข้มข้นที่แตกต่างกันตั้งแต่ 1-5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 4 การศึกษาผลของชนิดแหล่งไนโตรเจน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ในอาหาร Nitrogen deficient medium ที่ประกอบด้วยกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

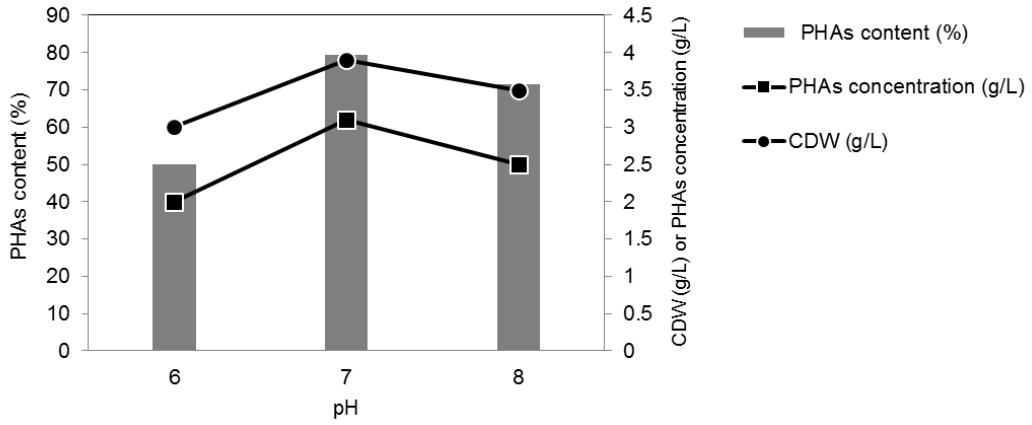
1.5 ผลของค่าความเป็นกรดด่าง

การศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิต PHAs พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrogen deficient medium ที่ประกอบด้วย 3% (w/v) glucose, 0.25%(w/v) yeast extract และ 0.25%(w/v) peptone ที่ pH 7.0 ผลิต PHAs เท่ากับ 79.5% (3.1 กรัมต่อลิตรของน้ำหนัก PHAs ต่อ 3.9 กรัมต่อลิตรของน้ำหนักเซลล์แห้ง) (ภาพที่ 5) โดยทั่วไป pH 7.0 เป็นค่า pH ที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรีย และพบว่า *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ผลิต PHB ได้ในปริมาณที่มากกว่า *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PW3A ที่ผลิต PHB ได้เพียง 0.3453 กรัมต่อลิตรเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อเพื่อผลิต PHB ซึ่งประกอบด้วย glucose 50 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, $MgSO_4$ 0.2 g/L, NaCl 0.1 g/L, peptone 2.5 g/L, yeast extract 2.5 g/L ที่ค่าพีเอช 7 (Babruwad *et al.,* 2015)

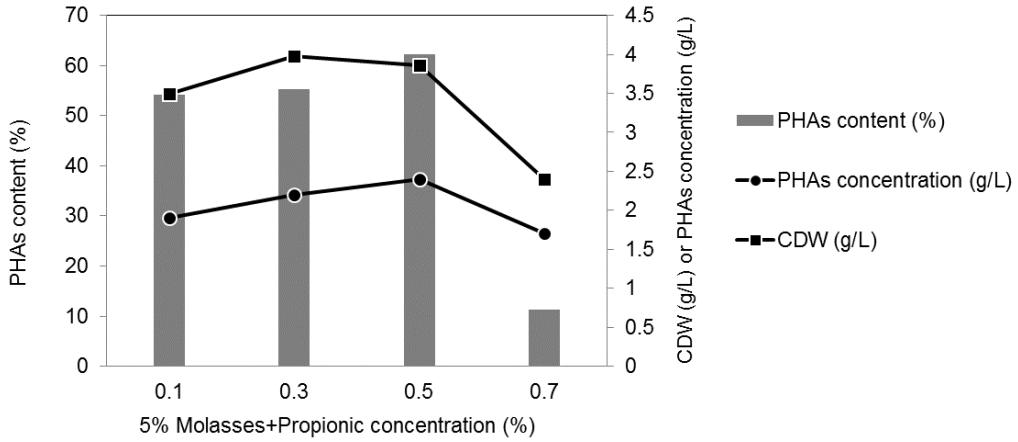
1.6 การผลิต PHBV จากกากน้ำตาลร่วมกับกรดโพรพิโอนิก

การศึกษาการผลิต PHBV จากกากน้ำตาลพบว่า เชื้อสายพันธุ์ PE3 ผลิต PHBV ที่ความเข้มข้น 5% (v/v) กากน้ำตาล และ 0.5% (w/v) กรดโพรพิโอนิก ผลิตได้เท่ากับ 62.2% (2.4 กรัมต่อลิตรของน้ำหนัก PHAs) (ภาพที่ 6) การเติมกรดโพรพิโอนิกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นสับสเตรทร่วม (cosubstrate) สำหรับการผลิต PHBV ถ้าใช้ความเข้มข้นที่มากเกินไปอาจเป็นพิษต่อเซลล์ Ramsay *et al.* (1990) พบว่า *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas pseudoflava*, *Pseudomonas cepacia* (ปัจจุบันเปลี่ยนเป็น *Burkholderia cepacia*) และ *Micrococcus halodenitrificans* สะสม PHBV เมื่อเลี้ยงในกลูโคส กรดโพรพิโอนิก และจำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจน และพบว่า *Bacillus cereus* เจริญได้ใน 5 กรัมต่อลิตรของกรดโพรพิโอนิก แต่ไม่เกิดกระบวน PHA synthesis ที่มีความเข้มข้นต่ำของกรด ผลของ

กรดอินทรีย์ที่มีต่อการสะสม PHBV ขึ้นกับความเข้มข้นและชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เป็นปัจจัยสำคัญในการผลิต เช่น ถ้าให้เซลล์มีการสะสม PHB จะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส และกรดบิวทิริก แต่ถ้าให้สะสม PHBV ต้องเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส ซูโครส กรดบิวทิริก กรดวาเลอริก และกรดโพรพิโอนิก (Nurbas & Kutsal, 2004)



ภาพที่ 5 การศึกษาผลของความเป็นกรดด่างเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ในอาหาร Nitrogen deficient medium ที่ประกอบด้วย 3% (w/v) glucose 0.25%(w/v) yeast extract และ 0.25%(w/v) peptone ปรับค่าพีเอชต่างกันตั้งแต่ 6-8 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



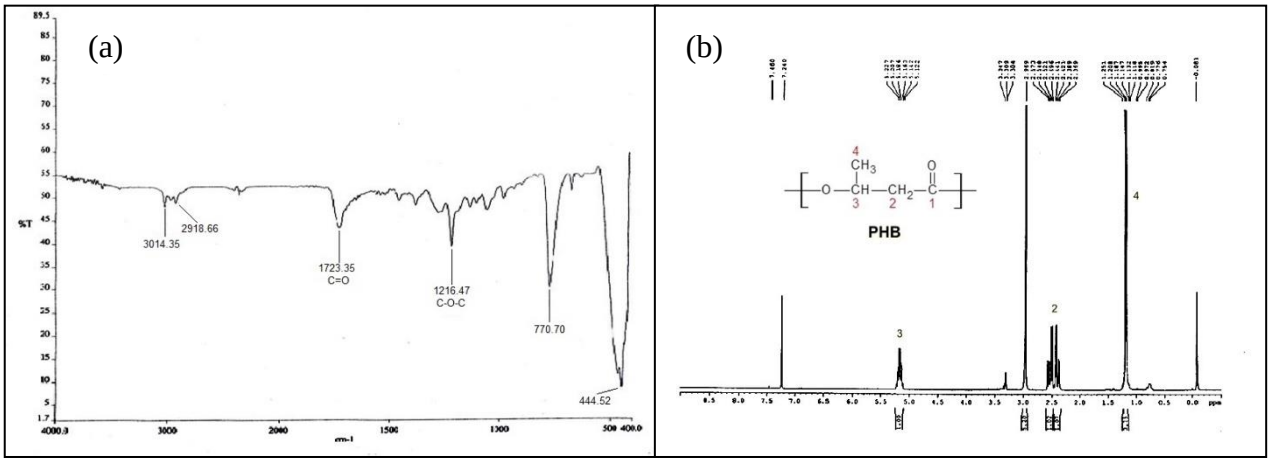
ภาพที่ 6 การศึกษาการผลิต PHBV เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ในอาหาร Nitrogen deficient medium ที่ประกอบด้วย 5 % (w/v) กากน้ำตาล 0.25 % (w/v) peptone 0.25 % (w/v) yeast extract และกรดโพรพิโอนิกที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1- 0.5 % (w/v) ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. การวิเคราะห์ PHAs ด้วยวิธี FTIR และ NMR

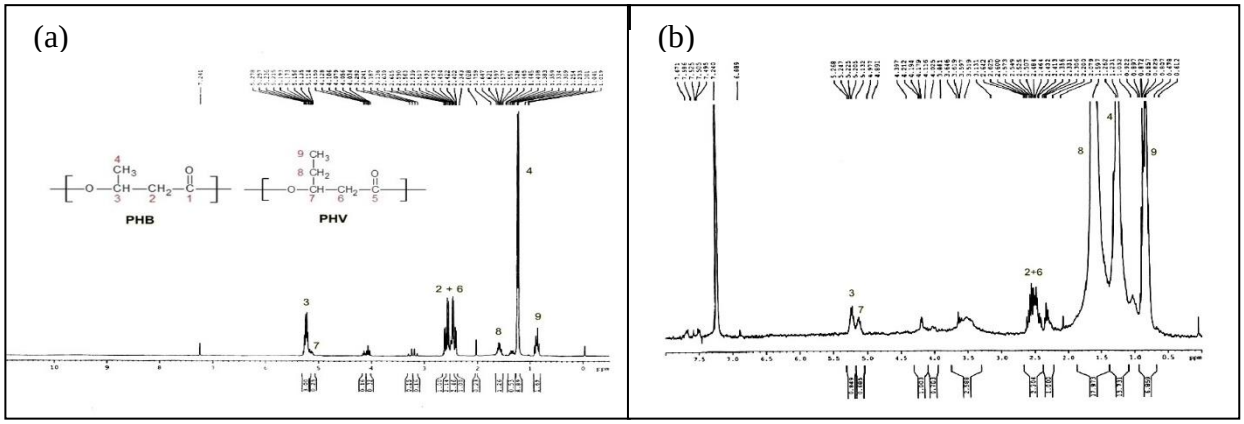
จากผลการวิเคราะห์สเปกตรัมของตัวอย่างจากสายพันธุ์ PE3 ที่เลี้ยงด้วยกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนปรากฏแถบการดูดกลืนของคาร์บอนิล (C=O) ของหมู่เอสเทอร์ ที่บริเวณ 1723.35 cm^{-1} และของ C-O-C ที่บริเวณ 1216.47 cm^{-1} ดังแสดงในภาพที่ 7(a) เมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสาร PHB มาตรฐาน พบแถบการดูดกลืนของคาร์บอนิล (C=O) ที่บริเวณ 1722.58 cm^{-1} และ C-O-C ที่บริเวณ 1280.69 cm^{-1} ของหมู่เอสเทอร์ ซึ่งทั้งสองค่ามีเลขคลื่นที่ใกล้เคียงกันมากจึงสามารถสรุปได้ว่าตัวอย่างที่สกัดได้เป็นสารประเภทเดียวกันกับ PHB บริสุทธิ์

การวิเคราะห์ทั้งโปรตอน (^{1}H) ที่ความถี่ 300 MHz และ คาร์บอนอะตอม (^{13}C) ที่ความถี่ 75 MHz โดยใช้ $CDCl_3$ และ CD_3OD เป็นตัวทำละลายผสม ผลการวิเคราะห์ ^{1}H NMR spectrum แสดงในรูปที่ 7 (b) พบสัญญาณแบบ doublet ของ methyl proton ตำแหน่ง 4 ที่ δ 1.19 ppm สัญญาณแบบ doublet of doublet จำนวน 2 ชุด ของ methylene proton ตำแหน่ง 2 ที่ δ ในช่วง 2.4-2.7 ppm และสัญญาณแบบ multiplet ของ methine proton ตำแหน่ง 3 ที่ δ ในช่วง 5.2-2.3 ppm ส่วนผลการวิเคราะห์ ^{13}C NMR spectrum พบสัญญาณของ methyl carbon ตำแหน่ง 4 ที่ δ 19.6 ppm methylene carbon ตำแหน่ง 2 ที่ δ 40.7 ppm methane carbon ตำแหน่ง 3 ที่ δ 67.65 ppm และ carbonyl carbon ที่ δ 169.3 ppm จากข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR สรุปได้ว่าพลาสติกชีวภาพที่ได้จากสายพันธุ์ PE3 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่เหมาะสมในการผลิต คือ PHB วิธี FTIR และ NMR เป็นวิธีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โครงสร้างของ PHB ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ที่ได้มีการศึกษาการผลิต PHB จากเชื้อ *Bacillus cereus* PW3A (Bubruwad *et al.,* 2015), *Bacillus mycoides* (Aarthi & Ramana, 2011) และ *Bacillus thuringiensis* (Rohini *et al.,* 2006)

เมื่อนำสายพันธุ์ PE3 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลและกรดโพรพิโอนิก จากข้อมูล NMR ดังแสดงในภาพที่ 8 (b) พบสัญญาณของ P(HB) ที่ค่า δ 1.1-1.4 ppm (methyl proton ที่ตำแหน่ง 4) ค่า δ 2.4-2.6 ppm (methylene proton ที่ตำแหน่ง 2) ค่า δ 5.2-5.3 ppm (methine proton ที่ตำแหน่ง 3) และพบสัญญาณของ P(HV) ที่ ค่า δ 0.7-0.9 ppm (methyl proton ที่ตำแหน่ง 9), ค่า δ 1.4-1.7 ppm (methylene proton ที่ตำแหน่ง 8), ค่า δ 2.4-2.6 ppm (methylene proton ที่ตำแหน่ง 6) และค่า δ 5.1-5.2 ppm (methine proton ที่ตำแหน่ง 7) เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล ^{1}H NMR ที่ได้กับ PHBV มาตรฐาน (ภาพที่ 8 (a)) แสดงว่าแบคทีเรียมีการผลิต PHBV เมื่อใช้กากน้ำตาล และกรดโพรพิโอนิกเป็นสับสเตรทร่วมกันในการผลิต



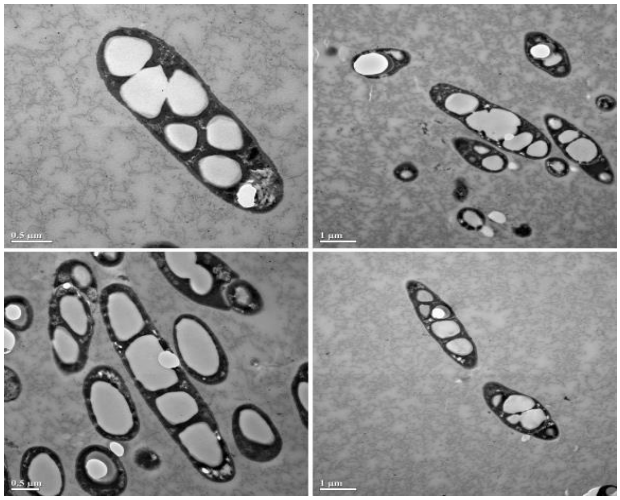
ภาพที่ 7 FTIR (a) และ NMR spectrum (b) ของการผลิต PHB จากเชื้อ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 เมื่อเลี้ยงในแหล่งอาหารที่มีสภาวะเหมาะสม นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 8 NMR spectrum ของ PHBV มาตรฐาน (a) และPHBV ที่สกัดได้จาก *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Nitrogen deficient medium ที่ประกอบด้วย 5 % (w/v) กากน้ำตาล 0.25 % (w/v) peptone 0.25 % (w/v) yeast extract และ 0.5 % (w/v) กรดโพรพิโอนิก ที่ค่าพีเอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. การสะสม PHAs ในเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

การสะสม PHB จากแบคทีเรียสายพันธุ์ PE3 พบว่าลักษณะของตัวเซลล์ที่เป็นรูปท่อน มองเห็นส่วนของแกรนูล PHB สีขาวได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 9) มีการสะสมแกรนูล ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 ไมโครเมตร เรียงตัวตามความยาวของตัวเซลล์ตั้งแต่ 2-7 แกรนูล



ภาพที่ 9 แกรนูล PHB ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ที่เลี้ยงบนอาหาร Nitrogen deficient agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่กำลังขยาย 5000 เท่า

สรุปผลการวิจัย

PHAs เป็นเทอร์โมพลาสติกสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในหลายๆ ด้าน เช่น ด้านอาหาร ด้านการแพทย์ ซึ่งพลาสติกที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ได้แก่ PHB และPHBV ในการผลิต PHAs ต้องคำนึงถึงต้นทุนการผลิต ดังนั้นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่น่าสนใจส่วนใหญ่จะได้จากวัสดุเหลือใช้ทางธรรมชาติ หรือของเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรม เช่น กากน้ำตาล กลีเซอรอล น้ำแช่ข้าวโพด (Gouda *et al.,* 2001) จากการศึกษาพบว่า *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 สามารถผลิต PHB เท่ากับ 79.5 % (3.1 กรัมต่อลิตรของ PHB) ที่สภาวะเหมาะสมต่อการผลิต นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถผลิต PHBV ได้เมื่อใช้กากน้ำตาลและกรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับการศึกษาต่อไปนั้นควรนำ PHB ที่สกัดได้มาศึกษาคุณสมบัติเชิงกลและคุณสมบัติความร้อนของพอลิเมอร์เพื่อดูความเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอนาคต สำหรับการผลิต PHBV ควรศึกษาหน่วย HB ต่อ HV ในสภาวะที่เหมาะสม และศึกษาคุณสมบัติของพลาสติกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2558 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สัญญาวิจัยเลขที่ 188/2558) และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้การสนับสนุนทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Aarthi, N. & Ramana, K.V. (2011). Identification and characterization of polyhydroxybutyrate producing *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides* strains. *International Journal of Environmental Sciences, 1,* 744-756.

Aldor, S.I. & Keaslingy, J.D. (2003). Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Current Opinion in Biotechnology, 14,* 475-483.

Anderson, A.J. & Dawes, E.A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews, 54,* 450-472.

Babruwad, P.R., Prabhu, S.U., Upadhyaya, K.P. & Hungund, B.S. (2015). Production and characterization of thermostable polyhydroxybutyrate from *Bacillus cereus* PW3A. *Journal of Biochemical Technology, 6,* 990-995.

Collins, S. (1987). Choice of substrate in polyhydroxybutyrate synthesis. *Special Publications of the Society for General Microbiology, 21,* 161-168.

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

Gowda, V. & Shivakumar, S. (2013). Poly(3)-hydroxybutyrate (PHB) production in *Bacillus thuringiensis* IAM 12077 under varied nutrient limiting conditions and molecular detection of class IV PHA synthase gene by PCR. *International Journal of Pharma and Bio Sciences, 4,* 794-802.

Grothe, E. & Chisti, Y. (2000). Poly(β-hydroxybutyric acid) thermoplastic production by *Alcaligenes latus*: behavior of fed-batch cultures. *Bioprocess Engineering, 22,* 441-449.

Hahn, S.K., Chang, Y.K., Kim, B.S. & Chang, H.N. (1994). Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recover using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnology and Bioengineering, 44,* 256-261.

Hourniel, K.L., Slater, S., Broyles, D., Casagrande, L., Colburn, S., Gonzalez, K., Mitsky, T.A., Reiser, S.E., Shah, D., Taylor, N.B., Tran, M., Valentin, H.E. & Gruys, K.J. (1999). Poly(β-hydroxybutyrate) production in oilseed leukoplasts of *Brassica napus*. *Planta, 209,* 547-550.

Joraleerut, P., Somyoonsap, P., Samosorn, S., Chansiri, K. & Sriyapai, T. (2014). Isolation and production by polyhydroxybutyrate (PHB) producing bacterial from soil. In *the 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference*. (pp. 229-236). Mae Fah Luang University.

Keshavarz, T. & Roy, I. (2010). Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology, 13,* 321-326.

Khanna, S. & Srivastava, A.K. (2005). Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha. Process Biochemistry, 40,* 2173-2182.

Kim, B.S., Lee, S.C., Lee, S.Y., Chang, H.N., Chang, Y.K. & Woo, S.L. (1994). Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnology and Bioengineering, 43,* 892-898.

Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B. & Thongchul, N. (2009). Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 107,* 240-245.

Lamoigne, M. (1926). Products of dehydration and polymerization of β-hydroxybutyric acid. *Bulletin de la Société de chimie biologique, 8,* 770–782.

Lee, S.Y. & Choi, J. (1999). Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste environment. Waste Management, *19*, 133-139.

Linko, S., Vahrte, H. & Seepällä, J. (1993). Production of poly-β-hydroxybutyrates by *Alcaligenes eutrophus* on different carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology, 39,* 11-15.

Matsusaki, H., Manji, S., Taguchi, K., Kato, Kato, M., Fukui, T. & Doi, Y. (1998). Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-*co*-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp. strain 61-3. *Journal of Bacteriology, 180,* 6459-6467.

Mittendorf, V., Robertson, E.J., Leech, R.M., KrÜger, N., SteinbÜchel, A. & Poirier, Y. (1998). Synthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Arabidopsis thaliana* using intermediates of peroxisomal fatty acid β-oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95,* 13397-13402.

Nurbas, M. & Kutsal, T. (2004). Production of PHB and P(HB-*co*-HV) biopolymers by using *Alcaligenes eutrophus*. *Iranian Polymer Journal, 13,* 45-51.

Ojumu, T.V., Yu, J. & Solomon, B.O. (2004). Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology, 43,* 18-24.

Page, W.J. (1992). Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture. *FEMS Microbiology Reviews, 103,* 149-158.

Ramsay, B.A., Lomaliza, K., Chavarie, C., Dubé, B., Bataille, P. & Ramsay, J.A. (1990). Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids. *Applied and Environmental Microbiology, 56,* 2093-2098.

Rohini, D., Phadnis, S. & Rawal, S.K. (2006). Synthesis and characterization of poly-β-hydroxybutyrate from *Bacillus thuringiensis* R1. *Indian Journal of Biotechnology, 5,* 276-283.

Singh, P. & Parmar, N. (2011). Isolation and characterization of two novel polyhydroxybutyrate (PHB)-producing bacteria. *African Journal of Biotechnology, 10,* 4907-4919.

SteinbÜchel, A. & Schlegel, H.C. (1991). Physiology and molecular genetics of poly(β-hydroxy-alkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Molecular Microbiology, 5,* 535-542.

Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M. & Shah, S. (2007). Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants. *Biotechnology Advances, 25,* 148- 175.

Tabanden, F. & Vasheghani-Farahani, E. (2002). Biosynthesis of poly-β-hydroxybutyrate as a biodegradable polymer. *Iranian Polymer Journal, 12,* 37-42.

Valappil, S.P., Rai, R., Bucke, C. & Roy, I. (2008). Polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Bacillus cerus* SPV under varied limiting conditions and an insight into the biosynthetic genes involved. *Journal of Applied Microbiology, 104,* 1624-1635.

Wang, J.G. & Bakken, L.R. (1998). Screening of soil bacteria for poly-β-hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation. *Microbial Ecology, 35,* 94-101.