การคัดแยกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากเชื้อบาซิลลัส

Screening and Optimization of Polyhydroxyalkanoate Production from *Bacillus* spp.

ดุษฎี มูลดา[1] สุดารัตน์ แซ่โจว[1] สุทธิชา ณ ระนอง ธรรมสิทธิรงค์[1,2] และ อานนท์ ธรรมสิทธิรงค์[1,2]*

Dudsadee Moonda[1], Sudarat Saechow[1],

Sutticha Na-Ranong Thammasittirong[1,2] and Anon Thammasittirong[1,2]*

[1]*โครงการจัดตั้งภาควิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน*

[2]*หน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพจุลินทรีย์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน*

[1]*Department of Microbiology, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus*

[2]*Microbial Biotechnology Unit, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus*

Received : 12 June 2017

Accepted : 6 July 2017

Published online : 1 August 2017

บทคัดย่อ

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHA) ถูกผลิตและสะสมในไซโทพลาซึมของแบคทีเรียหลายชนิดเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียบาซิลลัสที่สามารถผลิตสาร PHA ได้สูงพร้อมทั้งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA ผลการทดลองพบว่าจากเชื้อบาซิลลัสจำนวน 200 ไอโซเลท เชื้อไอโซเลท Bt109-16 สามารถผลิต PHA ได้สูงสุดที่ 0.45 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 34.31 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง) และหลังจากการปรับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงพบว่าเชื้อไอโซเลท Bt109-16 สามารถผลิต PHA ได้สูงสุดที่ 1.86 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 50.86 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อเลี้ยงในอาหาร nitrogen deficient ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 2 ทริปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.3 พีเอช 7.0 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และจากการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าไอโซเลท Bt109-16 คือ *Bacillus thuringiensis*

คำสำคัญ : บาซิลลัส พลาสติกชีวภาพ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน

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

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are produced and accumulated as granules in cytoplasm of various bacteria for carbon and energy storages. This work aimed to screen the high PHA-producing *Bacillus* bacteria and optimize culture conditions for PHA production. The results revealed that among 200 bacterial isolates, Bt109-16 is the most efficient PHA producing bacterium (0.45 g/L, 34.31% of dry cell weight (DCW)). The maximum PHA production of 1.86 g/L (50.86% DCW) was achieved when culturing the Bt109-16 in the optimized medium containing 2% (w/v) sucrose, 0.3% (w/v) tryptone, pH 7.0 and cultured at 37°C for 72 h. Identification using 16S rRNA gene sequencing revealed that the Bt109-16 was *Bacillus thuringiensis*.

Keywords : *Bacillus,* bioplastic, polyhydroxyalkanoates, carbon source, nitrogen source

บทนำ

ปัจจุบันพลาสติกได้เข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวันเป็นอย่างมาก มีปริมาณการใช้สูงตามปริมาณของประชากรโลกที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ปริมาณขยะจากผลิตภัณฑ์พลาสติกก็สูงขึ้นตาม ซึ่งส่งผลให้เกิดปัญหากับสิ่งแวดล้อมจากการจัดการของเสียจากพลาสติกที่ย่อยสลายยาก การฝังกลบเป็นวิธีการกำจัดขยะที่ง่ายและประหยัดค่าใช้จ่ายแต่ไม่สามารถแก้ปัญหาขยะพลาสติกได้ การเผาทำลายขยะพลาสติกยังทำให้เกิดแก๊สพิษและกลิ่นไม่พึงปรารถนาที่อาจก่ออันตรายต่อการดำรงชีพของสิ่งมีชีวิตได้ หนึ่งในทางเลือกในการช่วยลดปัญหานี้คือการใช้พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ง่าย โดยมีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมีและใช้งานในด้านต่าง ๆ ได้ดี แต่ขณะเดียวกันก็ย่อยสลายง่ายและรวดเร็วกว่า เช่น พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates, PHA) จัดเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียหลากหลายชนิด PHA เป็นสารกลุ่มพอลิเอสเทอร์ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกที่ใช้กันในปัจจุบัน โดยสาร PHA ที่เชื้อแบคทีเรียผลิตขึ้นที่มีการศึกษากันมากที่สุดคือ พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB) ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกที่ใช้กันทั่วไปมากที่สุด (Suriyamongkol *et al*., 2007)

นักจุลชีววิทยาชาวฝรั่งเศสได้ค้นพบการผลิตและสะสมสาร PHA เป็นครั้งแรกในรูปของสาร PHB ภายในเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus megaterium* (Luengo *et al*., 2003) และมีการพบการสะสม PHA ในเซลล์ของแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ อีกมากมายทั้งแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Alcaligenes* spp., *Pseudomonas* spp. (Anderson and Dawes, 1990) และแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *B. cereus* (Aly *et al*., 2013) และ *B. thuringiensis* (Charen *et al*., 2014) แม้ว่าการผลิต PHA โดยเชื้อแบคทีเรียแกรมลบจะสามารถทำได้ง่ายกว่ารวมทั้งมีการสะสมภายในเซลล์ที่มากกว่า แต่การผลิต PHA โดยแบคทีเรียแกรมลบมักมีการปนเปื้อนของ lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งอยู่บริเวณ outer membrane ของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ที่ทนต่อความร้อนได้ดี และกำจัดได้ยากมาก แม้จะใช้วิธีการให้ความร้อนหรือการฉายรังสี (Rai *et al*., 2011) แต่สามารถทำลายด้วยสารเคมี เช่น hydrogen peroxide และ benzoyl peroxide แต่อาจทำให้คุณสมบัติของ PHA เปลี่ยนแปลงไป (Tan *et al*., 2014) ส่งผลให้ PHA ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมลบไม่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้เป็นพลาสติกที่ต้องการความบริสุทธิ์สูง เช่น วัสดุอุปกรณ์ในด้านการแพทย์ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกไม่มี outer membrane จึงเป็นทางเลือกสำหรับการผลิตพลาสติกชีวภาพที่มีความบริสุทธิ์สามารถประยุกต์ใช้ในด้านการแพทย์

โดยการสร้าง PHA เป็นกระบวนการทางชีวภาพจึงต้องคำนึงปัจจัยหลายประการที่จะส่งผลต่อชนิด คุณสมบัติ และปริมาณของ PHA ที่ผลิตได้ เนื่องจากมีกลไกการสังเคราะห์ที่ซับซ้อนสามารถเปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อม การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวของในการสร้าง PHA และเมตาบอลึซึมของเซลล์แบคทีเรีย โดยเฉพาะแหล่งสารอาหาร และสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกแบคทีเรียแกรมบวกในจีนัส *Bacillus* ที่มีความสามารถในการผลิต PHA พร้อมทั้งศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA ให้ได้ผลผลิตสูง เพื่อเป็นแนวทางในทางในการพัฒนาการผลิตพลาสติกชีวภาพต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การคัดเลือกแบคทีเรียผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHA)

นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 200 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างดินจากภูมิภาคต่าง ๆ ทั่วประเทศไทยและผ่านการตรวจสอบคุณลักษณะต่าง ๆ แล้วว่าเป็นเชื้อ *Bacillu*s spp. โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ ดร. ทิพย์วดี อรรถธรรม ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน มาทดสอบการสร้างและสะสม PHA ด้วยวิธีการย้อมสี Sudan black B โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแบบ point inoculation ลงบนอาหาร nutrient agar (NA) ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้อมสีโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย Sudan black B เป็นเวลา 30 นาที และล้างออกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 ตามวิธีที่รายงานโดย Mohamed *et al.*, (2012) หลังจากนั้นนำไอโซเลทที่โคโลนีติดสีน้ำเงินเข้มของ Sudan black B มาทำการย้อมเซลล์ โดยเตรียมสเมียร์เชื้อบนสไลด์ และทำการย้อมเซลล์แบคทีเรียด้วยสี Sudan black B เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นล้างสไลด์ด้วย xylene แล้วนำมาย้อมด้วยสี Safranin-O เป็นเวลา 10 วินาที และล้างออกด้วยน้ำ (Murray *et al.*, 1994) จากนั้นนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และทำการคัดเลือกไอโซเลทที่เซลล์มีส่วนของแกรนูลขนาดใหญ่ที่ติดสี Sudan black B เข้มไปใช้ในการทดลองต่อไป

การผลิต PHA ในอาหารเหลว

เตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่สามารถผลิต PHA ได้สูงจากขั้นตอนก่อนหน้า โดยปลูกเชื้อ 1 ลูป ในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้ได้เท่ากับ 1.0 และถ่ายกล้าเชื้อลงในอาหาร NB ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 5 ในอัตราร้อยละ 2 โดยปริมาตร จากนั้นนำไปบ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทำการวิเคราะห์หามวลเซลล์และปริมาณ PHA ที่ผลิตได้

1. การวิเคราะห์มวลเซลล์ด้วยน้ำหนักเซลล์แห้ง

หาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยนำเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำตะกอนเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ แล้วคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งต่ออาหารปริมาตร 1 ลิตร

2. การวิเคราะห์ปริมาณ PHA ชนิด PHB (ดัดแปลงจาก Slepecky and Law, 1960; Santhanam and Sasidharan, 2010)

ทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และทำการล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และล้างด้วยอะซิโตน เมทานอล และไดเอทิลอีเทอร์ (1:1:1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปต้มในน้ำเดือด จนคลอโรฟอร์มระเหยหมด และเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเปลี่ยนพลาสติกไปเป็นกรดโครโทนิค นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณ PHA เทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดโครโทนิค และคำนวณร้อยละการสะสมของ PHA โดยการเทียบอัตราส่วนระหว่างปริมาณ PHA (กรัมต่อลิตร) กับน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ดังสมการที่ 1

$$\text{ร้อยละการสะสม PHA} = \frac{\text{ความเข้มข้น PHA (กรัมต่อลิตร)}}{\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)}} \times 100 \qquad (1)$$

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA

นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีการสะสม PHA ได้สูงสุดมาศึกษาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมในผลิต PHA เตรียมกล้าเชื้อโดยเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในอาหารเหลว NB บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 1.0 และถ่ายกล้าเชื้อลงในอาหาร nitrogen deficient ($MgSO_4$ 0.2 g/L, NaCl 0.1 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, Peptone 2.5 g/L, Yeast extract 2.5 g/L และ Sucrose 10 g/L) (Pal *et al.*, 2009) ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร โดยมีการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ เช่น เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลกลูโคส กากน้ำตาล แป้ง และกลีเซอรอล ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนจาก Yeast extract และ Peptone เป็นแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต สารสกัดยีสต์ ยูเรีย และทริปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ศึกษาผลความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ทราบผลว่าเชื้อสามารถผลิต PHA ได้ดีที่สุด มาปรับให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ ร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนโดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่ทราบผลว่าเชื้อสามารถผลิต PHA ได้ดีที่สุดมาปรับความเข้มข้นเป็นร้อยละ 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35 และ 0.40 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ศึกษา pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยปรับค่า pH ที่ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 และศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อโดยบ่มเชื้อที่ 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 และ 96 ชั่วโมง โดยแต่ละการทดลองทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที และนำไปวิเคราะห์ปริมาณ PHA ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการจัดจำแนกแบคทีเรียด้วยอณูชีววิทยา

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดเลือก โดยนำเชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลทที่ผลิต PHA ได้สูงสุดมาศึกษา รูปร่าง การติดสีแกรม การสร้างสปอร์ และจัดจำแนกสายสายพันธุ์แบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA กับที่รายงานในฐานข้อมูลของ GenBank จาก National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHA

จากการนำแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 200 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการสร้าง PHA ด้วยการย้อมสีโคโลนีและเซลล์ของแบคทีเรียด้วยสี Sudan Black B พบแบคทีเรียที่สะสม PHA 9 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 4.5 และจากการศึกษาการผลิต PHA ในอาหารเหลว พบว่าไอโซเลทที่มีการผลิต PHA ได้มากที่สุดคือ Bt109-16 ซึ่งมีการสะสม PHA ร้อยละ 34.31 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (ตารางที่ 1) ดังนั้นจึงเลือกใช้เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Bt109-16 ในการศึกษาต่อไป

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการจัดจำแนกแบคทีเรีย Bt109-16 ด้วยอณูชีววิทยา

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเชื้อไอโซเลท Bt109-16 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน สร้างเอนโดสปอร์ และผลการจำแนกชนิดโดยวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene กับลำดับที่รายงานในฐานข้อมูล NCBI พบว่าไอโซเลท Bt109-16 เป็นเชื้อ *Bacillus thuringiensis* โดยมีความเหมือนร้อยละ 99 และจากการศึกษาการผลิต PHA ที่พบว่าเชื้อ Bt109-16 มีการสะสม PHA ร้อยละ 34.31 ของน้ำหนักเซลล์แห้งนั้น สอดคล้องกับรายงานของ Pal *et al*. (2009) ที่รายงานว่าเชื้อ *B. thuringiensis* IAM 12077 สามารถผลิตและสะสม PHA ชนิด PHB ได้ร้อยละ 24-43 ของน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Charen *et al*. (2014) ที่รายงานถึงการผลิตและสะสม PHB จากเชื้อ *B. thuringiensis* GVP ได้ร้อยละ 31.26 ของน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. thuringiensis* สามารถผลิต PHA ได้ โดยความสามารถในการผลิตและสะสม PHA แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์แบคทีเรียและสภาวะที่ใช้เลี้ยง

ตารางที่ 1 การสะสม PHA ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก

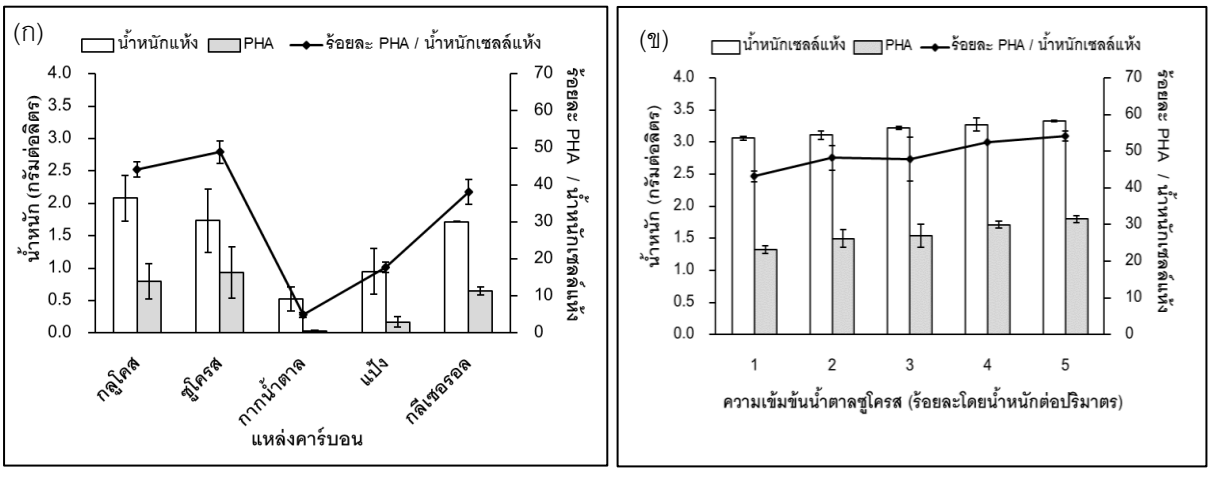
Isolate	PHA (g/L)	PHA accumulation (% of DCW)
Bt109-16	0.4529	34.31
Bt109-6	0.3518	26.06
Bt111-18	0.0674	8.87
Bt111-21	0.0978	15.52
Bt111-30	0.0392	4.84
Bt123-1	0.0644	9.08
Bt127-1	0.3710	28.98
Bt142-2	0.0099	1.01
Bt143-9	0.1032	12.43

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA

1. ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต PHA

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* ไอโซเลท Bt109-16 ในอาหาร nitrogen deficient ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส กากน้ำตาล แป้ง และกลีเซอรอล พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Bt109-16 สามารถผลิต PHA ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดได้ แต่ผลิตและสะสม PHA ได้ดีไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาพที่ 1ก) โดยมีการสะสม PHA ภายในเซลล์สูงที่สุด (ร้อยละ 48.89 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง) ในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสอดคล้องกับ Singhaboot and Kaewkannetra (2015) ที่ศึกษาการผลิต PHA โดยเชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* โดยใช้แหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลซูโครส พบว่าน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA ซึ่งมีการสะสม PHA ร้อยละ 78.09 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสในการย่อยน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นไดแซคคาไรด์ โดยได้ผลิตภัณฑ์คือน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตส อย่างละ 1 โมล ที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดไปใช้ในการเจริญและการผลิต PHA ได้ดีกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสเพียงชนิดเดียว ประกอบกับราคาน้ำตาลซูโครสที่ถูกกว่าจึงเลือกใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHA ในการทดลองต่อไป

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาพที่ 1ข) โดยเชื้อมีการสะสม PHA น้อยที่สุด (ร้อยละ 43.12 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่ความเข้มข้นน้ำตาลร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และพบว่าเชื้อมีการสะสม PHA ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสร้อยละ 2-5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ดังนั้นจึงใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในการผลิต PHA ต่อไป ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Aly *et al*. (2013) ที่รายงานถึงความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต PHA โดยเชื้อ *Bacillus cereus* MM7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คือน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

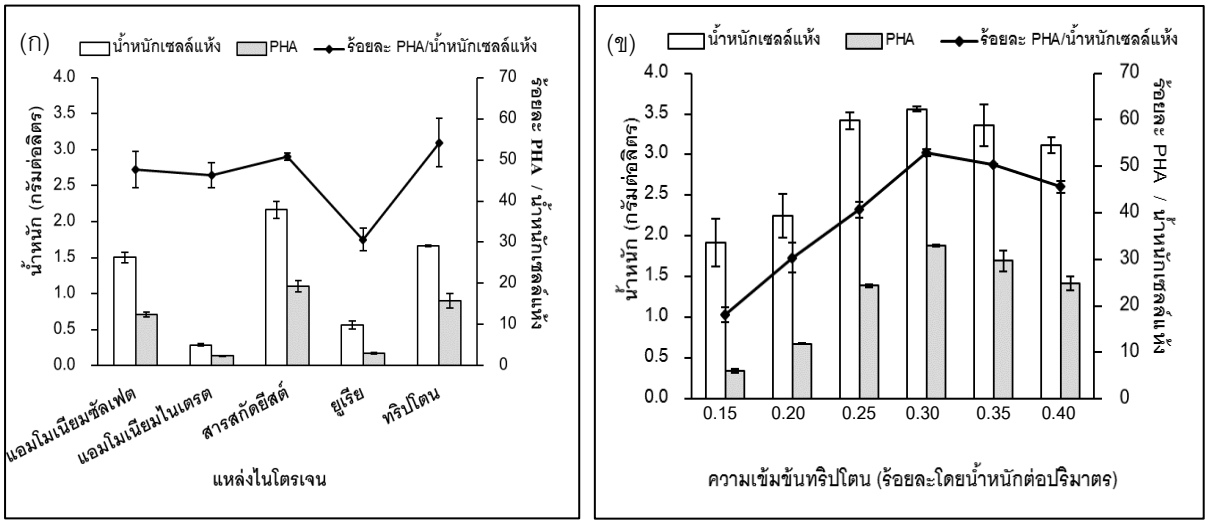


ภาพที่ 1 การผลิต PHA ของเชื้อแบคทีเรีย *B. thuringiensis* Bt109-16 (ก)ในอาหาร Nitrogen deficient ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ และ (ข) ในอาหาร Nitrogen deficient ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 1-5 เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ผลของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิต PHA

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Bt109-16 ในอาหาร nitrogen deficient ที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต สารสกัดยีสต์ ยูเรีย และทริปโตน พบว่าเชื้อสามารถผลิต PHA ได้ปริมาณสูงสุดในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ สารสกัดยีสต์ รองลงมาคือ ทริปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย และแอมโมเนียมไนเตรต ตามลำดับ (ภาพที่ 2ก) แต่พบว่ามีการสะสม PHA สูงสุดคือร้อยละ 54.21 โดยน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีทริปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานโดย Taran (2011) ที่พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิต PHA ของเชื้อ *Haloarcula* sp. IRU1 คือ ทริปโตน ดังนั้นจึงเลือกใช้ทริปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิต PHA ต่อไป

และจากการศึกษาผลของทริปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35 และ 0.40 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อสามารถผลิต PHA ได้ปริมาณสูงในอาหารที่มีทริปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.30 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยผลิต PHA ได้ 1.88 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 52.91 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง) (ภาพที่ 2ข) ดังนั้นจึงเลือกใช้ทริปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.30 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในการผลิต PHA ต่อไป



ภาพที่ 2 การผลิต PHA ของเชื้อแบคทีเรีย *B. thuringiensis* Bt109-16 (ก) ในอาหาร Nitrogen deficient ที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ และ (ข) ในอาหาร Nitrogen deficient ที่มีทริปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.15-0.40 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

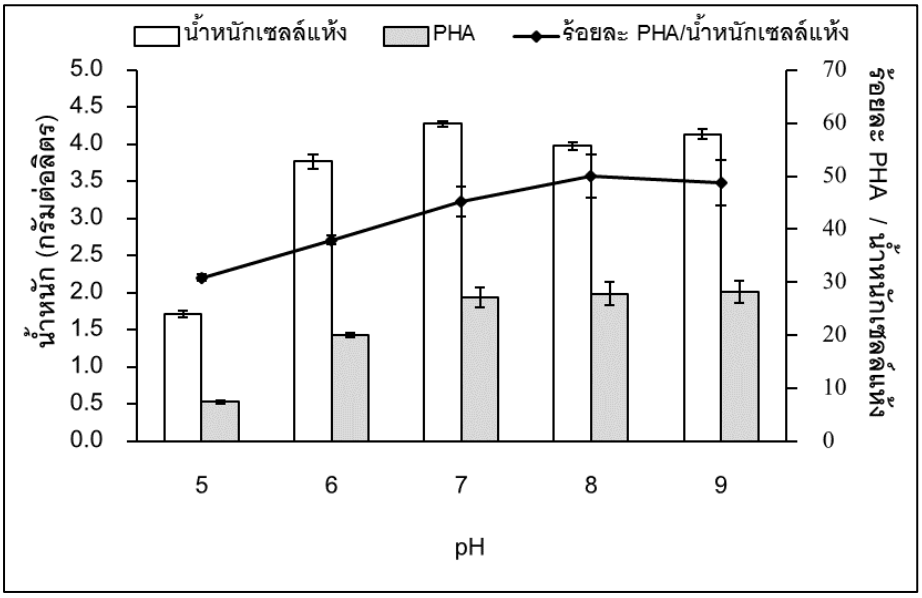
ผลของ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิต PHA

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bt109-16 ในอาหาร nitrogen deficient ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทริปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และมี pH ต่าง ๆ คือ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 พบว่ามีแบคทีเรียเจริญได้ดีที่ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 7.0-9.0 โดยสามารถผลิต PHA ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 3) ที่ pH 5-6 เซลล์มีการเจริญน้อยและผลิต PHA ได้น้อย ดังนั้น pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

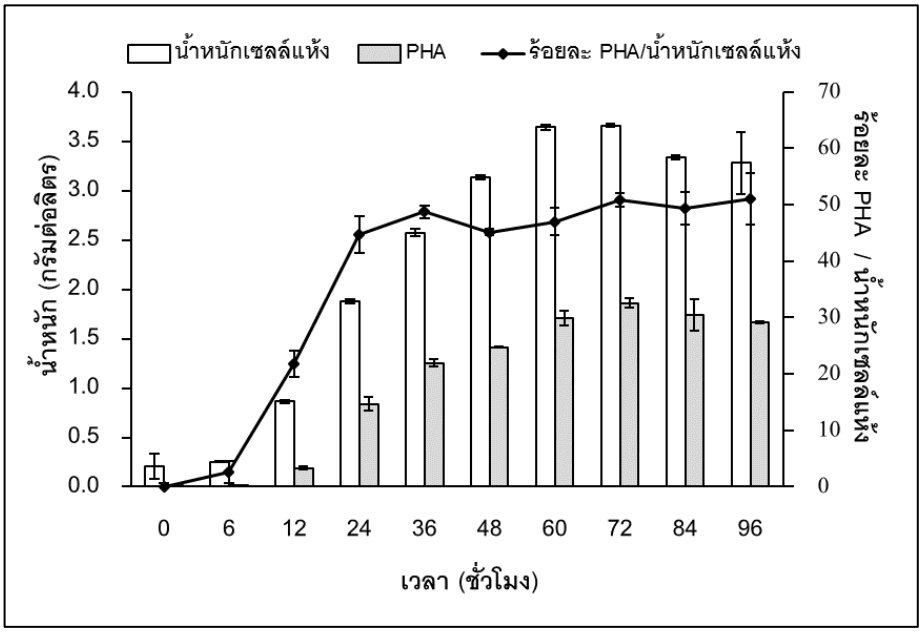
ในการผลิต PHA จึงไม่ควรต่ำกว่า pH 7.0 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่รายงานว่า pH อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิต PHA โดยเชื้อ *B. thuringiensis* คือ pH 7.5 (Desouky *et al*., 2014)

การศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อในการผลิต PHA

จากการเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bt109-16 ในอาหาร nitrogen deficient ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทริปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.30 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร pH เท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 และ 96 มาวิเคราะห์พบว่ามีปริมาณ PHA เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงชั่วโมงที่ 12-60 และปริมาณ PHA คงที่ในช่วงชั่วโมงที่ 60-96 (ภาพที่ 4) แสดงถึงเชื้อมีการสร้าง PHA ในระหว่างการเจริญใน log phase เมื่อจุลินทรีย์เข้าสู่ stationary phase จะมีการผลิต PHA คงที่ อาจเนื่องมาจากแหล่งคาร์บอนเริ่มหมด หรือ เซลล์ไม่มีเนื้อที่พอที่จะเก็บแกรนูล PHA (Luengo *et al*., 2003) ผลการทดลองพบว่าใน stationary phase ที่ชั่วโมงที่ 72 เชื้อมีการสะสม PHA มากที่สุดเท่ากับร้อยละ 50.86 โดยน้ำหนัก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Gowda and Shivakumar (2013) ที่รายงานว่า *B. thuringiensis* มีการสะสม PHA มากที่สุดใน stationary phase



ภาพที่ 3 การผลิต PHA ของเชื้อแบคทีเรีย *B. thuringiensis* Bt109-16 ในอาหาร Nitrogen deficient ที่มี pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง 5-9 เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 4 การผลิต PHA ของเชื้อแบคทีเรีย *B. thuringiensis* Bt109-16 ในอาหาร Nitrogen deficient ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทริปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.30 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร pH 7.0 บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

สรุปผลการวิจัย

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHA ด้วยวิธีการย้อมสีโคโลนีและเซลล์จุลินทรีย์ด้วยสี Sudan Black B สามารถคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิต PHA ได้สูงที่สุดคือ แบคทีเรียไอโซเลท Bt109-16 มีการสะสม PHA ร้อยละ 34.31 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อนำมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA พบว่ามีการสะสม PHA เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 50.86 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร nitrogen deficient ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทริปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.30 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร pH 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากการจัดจำแนกพบว่าแบคทีเรียไอโซเลท Bt109-16 คือเชื้อ *Bacillus thuringiensis*

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยบางส่วนจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จังหวัดนครปฐม และ โครงการจัดตั้งภาควิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ ปีงบประมาณ 2560

เอกสารอ้างอิง

Aly, M.M., Albureikan, M.O., Rabey, H. E and Kabli, S.A. (2013). Effects of culture conditions on growth and poly-β-hydroxybutyric acid production by *Bacillus cereus* MM7 isolated from soil samples from Saudi Arabia. *Life Sciences, 10*(4), 1884-1891.

Anderson, A. J. and Dawes E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 54*(4), 450-472.

Charen, T., Vaishali, P., Kaushalya, M., Amutha, K., Ponnusami, V. and Gowdhaman, D. (2014). Isolation and identification of polyhydroxybutyrate producing bacterial strain (*Bacillus thuringiensis* GVP) from chlorine contaminated soil. *International Journal of ChemTech Research, 6*(5), 3197-3202.

Desouky, S.E., Shiekh, H.H., Elabd, M.A. and Shehab, A.M. (2014). Screening, optimization and extraction of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from *Bacillus thuringienesis*. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology, 1*(1), 40-54.

Gowda, V. and 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 Pharmaceutical and Biological Sciences, 4*(1), 794–802.

Luengo, J.M., Garcia, B., Sandoval, A., Naharre, G. and Olivera, E.R. (2003). Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology, 6*, 251-260.

Mohamed, T., Shaaban, M., Azza, T. and Mowafy, E.I. (2012). Production of some biopolymers by some selective Egyptian soil bacterial isolates. *Journal of Applied Sciences Research, 8*(1), 94-105.

Murray, R.G.E., Doetsch, R.N. and Robinow, C.F. (1994). Determinative and cytological light microscopy. In P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood and N.R. Krieg (Eds.), *Manual of methods for general microbiology*. (pp. 21-24). American Society for Microbiology.

Pal, A., Prabhu, A., Kumar, A.A., Rajagopal, B., Dadhe, K., Ponnamma V. and Shivakumar, S. (2009). Optimization of process parameters for maximum poly-β-hydroxybutyrate (PHB) production by *Bacillus thuringiensis* IAM 12077. *Polish Journal of Microbiology, 58*, 149-154.

Rai, R. Keshavarz, T., Roether, J.A., Boccaccini, A.R., Roy, I. (2011). Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Materials Science and Engineering: R: Reports, 72*, 29–47.

Santhanam, A. and Sasidharan, S. (2010). Microbial production of polyhydroxy alkanote (PHA) from *Alcaligens* spp. and *Pseudomonas oleovorans* using different carbon sources. *African Journal of Biotechnology*, *9*, 3144-3150.

Singhaboot, P. and Kaewkannetra, P. (2015). A higher in value biopolymer product of polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesized by *Alcaligenes latus* in batch/repeated batch fermentation processes of sugar cane juice. *Annals Microbiology, 65*, 2081-2089.

Slepecky, R.A. and Law, J.H. (1960). A rapid spectrophotometric assay of alpha, beta-unsaturated acids and beta-hydroxy acids. *Analytical Chemistry, 32*(12), 1697-1699.

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

Tan, G.Y. A., Chen, C.L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I.M.N., Li, Y., Zhao, L., Mo, Y., and Wang, Ji.Y. (2014). Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers*, *6*, 706-754.

Taran, M. (2011). Utilization of petrochemical wastewater for the production of poly (3-hydroxybutyrate) by *Haloarcula* sp. IRU1. *Journal of Hazardous Materials, 188*, 26-28.