

การผลิตพลาสติกชีวภาพพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากน้ำมันปาล์ม โดยใช้เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1287

ศุภรัตน์ จูติรัตนอัสว¹ สิริภัทร เทียนสันเทียะ¹ ปิ่นอนงค์ ธนิกกุล²
ศิริอร บุญญวนิช^{1,2} และ นิพนธ์ พิสุทธิไพศาล^{1,2,3*}

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพลาสติกชีวภาพประเภทพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต โดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ของ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1287 ทำการทดลองโดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 0.50, 0.75, 1.00, 1.50 และ 2.00 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ค่าความเป็นกรดค่า 6.90) ทำการทดลองแบบกะในตู้บ่มเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มนั้น มีผลต่อการเจริญเติบโต และน้ำหนักเซลล์แห้งของ *P. aeruginosa* TISTR 1287 โดยที่ความเข้มข้น 0.75% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 2.33 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงการหมักที่ 44 นอกจากนี้ช่วงระยะเวลาของการหมักอาหารนั้นยังมีผลต่อการผลิตและการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของแบคทีเรีย โดยปริมาณและผลผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สกัดได้ จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมักที่มากขึ้นและเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง มีปริมาณ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต 0.65 กรัมต่อลิตร (38.01%) เมื่อนำเซลล์แบคทีเรียไปวิเคราะห์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าเซลล์แบคทีเรียมีการเรืองแสงสีแดงของสีย้อม Nile red ได้ชัดเจน ในขณะที่เดียวกันก็สามารถเห็นลักษณะของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่แบคทีเรียสะสมไว้ในรูปของแกรนูลสีขาวอย่างชัดเจน เมื่อนำไปส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน จากผลการทดลอง จึงสรุปได้ว่า *P. aeruginosa* TISTR 1287 สามารถใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้

คำสำคัญ : พลาสติกชีวภาพ, พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHAs), น้ำมันปาล์ม, *Pseudomonas aeruginosa*

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร อาหาร และสิ่งแวดล้อม, คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

² ศูนย์ไบโอเซ็นเซอร์และไบโออิเล็กทรอนิกส์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

³ ศูนย์วิจัยด้านเทคโนโลยีผลิตภัณฑ์และพลังงานหมุนเวียน, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

* ผู้ติดต่อ, อีเมล: nipon.p@sci.kmutnb.ac.th, siriorn2002@yahoo.com รับเมื่อ 21 ธันวาคม 2560 ตอบรับเมื่อ 26 กุมภาพันธ์ 2561

Production of Polyhydroxyalkanoates Bioplastic from Palm Oil using *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1287

Suparat Thitirattanaus¹, Siraphat Teansantie¹, Pinanong Tanikkul²,
Siriorn Boonyawanich^{1,2} and Nipon Pisutpaisal^{1,2,3*}

Abstract

This research aimed to investigate factors affecting the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from palm oil as a carbon source by *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1287. The experiments were set-up a batch in an orbital shaker incubator at 30°C with 180 rpm. Four concentrations (0.50, 0.75, 1.00, 1.50 and 2.00 % (w/v)) of palm oil were tested and initial pH in the culture medium was fixed at 6.90. The results showed that the concentrations of palm oil have the effect on cell growth and cell dry weight of *P. aeruginosa* TISTR 1287. The maximum cell dry weight at 44 hrs was 2.33 g L⁻¹ obtained from the palm oil concentration of 0.75% (w/v). Moreover, the culture time also affected the cells growth and intracellular accumulation of PHAs. The PHAs concentration and content were increased when increasing the culture time from 0 to 72 hours. The maximum PHAs concentration was 0.65 g L⁻¹ and PHAs content was 38.01 % when cultured in medium with 0.75% (w/v) palm oil at 72 hrs fermentation. The microbial cells in the culture medium showed high red fluorescent, when the cells were determined using the fluorescent dye Nile red. The PHAs granules of intracellular the microbial cell were seen easily (white granules) by transmission electron microscope. The results demonstrated that *P. aeruginosa* TISTR 1287 can be used palm oil as a carbon source for producing the PHAs based bioplastics in an intracellular.

Keywords : Bioplastic, Polyhydroxyalkanoates (PHAs), Palm oil, *Pseudomonas aeruginosa*

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

² The Biosensor and Bioelectronics Technology Centre, King Mongkut's University of Technology North Bangkok.

³ Renewable Product and Energy Technology Centre, King Mongkut's University of Technology North Bangkok.

* Corresponding author, E-mail: nipon.p@sci.kmutnb.ac.th, siriorn2002@yahoo.com Received 21 December 2017,

Accepted 26 February 2018

1. บทนำ

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์พลาสติกเข้ามาเป็นส่วนหนึ่งในชีวิตประจำวันของมนุษย์ในรูปแบบต่างๆ เนื่องจากการนำมาใช้งานนั้นสะดวกสบาย ซึ่งผลิตภัณฑ์พลาสติกเหล่านี้เป็นพลาสติกชนิดที่สังเคราะห์มาจากปิโตรเคมี โครงสร้างของพลาสติกมีความแข็งแรงทนทานยากต่อการย่อยสลายเมื่อนำไปฝังในบ่อฝังกลบ ดังนั้นการผลิตพลาสติกจึงควรเลือกใช้วัสดุอื่นที่สามารถย่อยสลายได้ง่ายทางชีวภาพมาทดแทน และเลือกวัสดุมาใช้ให้เหมาะสมกับคุณสมบัติของพลาสติกชนิดนั้นๆ เพื่อลดปัญหาสิ่งแวดล้อมที่อาจเกิดขึ้นได้ ดังนั้น จึงมีการริเริ่มแนวคิดที่จะค้นคว้าเพื่อพัฒนาพลาสติกทางเลือกใหม่ขึ้นมาทดแทน โดยพลาสติกทางเลือกดังกล่าวมีคุณสมบัติเทียบได้กับพลาสติกจากปิโตรเคมี และยังสามารถย่อยสลายได้ง่ายกว่าด้วยกระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งเรียกพลาสติกประเภทดังกล่าวนี้ว่า พลาสติกชีวภาพหรือไบโอพลาสติก

ไบโอพลาสติก คือ พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เป็นพลาสติกที่ถูกออกแบบมาเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีภายใต้สภาวะแวดล้อมที่กำหนดไว้เฉพาะ ก่อให้เกิดการสูญเสียสมบัติบางประการ เช่น ความแข็งแรง ในปัจจุบันมีการพัฒนาพลาสติกชีวภาพขึ้นมาหลายชนิด แต่ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงพลาสติกจากปิโตรเคมีมากที่สุดมีอยู่ 2 กลุ่มหลัก ได้แก่ พอลิแลคติก (Polylactic acid; PLA) และ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates; PHAs) [1-3] ทั้งนี้ พบว่าพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตนั้นมีความเป็นพลาสติกที่ดีกว่า PLA และสามารถนำมาประยุกต์ใช้งานได้อย่างกว้างขวางมากกว่า นอกจากนี้พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตยังจัดเป็นพอลิเอสเทอร์

ชีวภาพ (Biopolyester) กลุ่มหนึ่งที่มี การสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตประเภทแบคทีเรีย ซึ่งการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในเซลล์ของแบคทีเรีย สามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะการเจริญเติบโตที่ไม่สมดุล (unbalanced growth condition) ได้แก่ สภาวะที่มีการจำกัดสารอาหารบางประเภท เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือซัลเฟต สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำ หรือเมื่ออัตราส่วนระหว่างสารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน ที่เติมเข้าสู่ระบบมีปริมาณมากเกินไป [1] นอกจากนี้ยังพบว่า ในสิ่งแวดล้อมมีแบคทีเรียจำนวนมาก ที่มีความสามารถในการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต [2] พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Lemoigne [3] ซึ่งพบว่าพอลิเมอร์ชนิดนี้ สังเคราะห์ภายในเซลล์ของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่เกิดความเครียด และมีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป ในระหว่างที่เซลล์มีสภาวะอดอาหาร โดยพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจะถูกนำมาใช้เสมือนเป็นแหล่งคาร์บอน และให้พลังงานแก่เซลล์ จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า มีแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้หลายชนิด แต่มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่ถูกนำมาใช้ในงานวิจัยเพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการในการเพิ่มปริมาณการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในเซลล์ของแบคทีเรีย อาทิเช่น *Ralstonia eutrophus* *Pseudomonas oleovorans* และ *Pseudomonas aeruginosa* [4-5] ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากแหล่งคาร์บอนที่มีอยู่ทั่วไป ได้แก่ กลูโคส และน้ำมันจากพืชชนิดต่างๆ เป็นต้น

ในปัจจุบันการนำพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตไปใช้ประโยชน์นั้น ถูกจำกัดด้วยต้นทุนในการผลิตที่สูง ทำ

ให้ไม่สามารถแข่งขันทางการค้ากับพลาสติกที่ผลิตมาจากปิโตรเคมีได้ ดังนั้น เพื่อให้สามารถแข่งขันด้านราคาในเชิงพาณิชย์ได้ จึงจำเป็นต้องหาวิธีในการลดต้นทุนการผลิตซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี มีงานวิจัยที่มีการค้นคว้าคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พบว่า ***Pseudomonas aeruginosa*** มีความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต [5] แต่อย่างไรก็ตามต้นทุนหลักในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต คือราคาของสารตั้งต้น ที่จะส่งผลต่อราคาของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วย งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะใช้น้ำมันปาล์ม ซึ่งมีต้นทุนการผลิตต่ำ มีผลผลิตต่อพื้นที่สูง แต่ราคาซื้อขายในตลาดไม่สูง ปัจจุบันเฉลี่ยกิโลกรัมละ 35.50 บาท นอกจากนี้ น้ำมันปาล์มยังประกอบด้วยกรดไขมันหลายชนิด ทำให้สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับแบคทีเรียในการสร้างพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับน้ำมันปาล์มได้อีกด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ของ ***Pseudomonas aeruginosa*** TISTR 1287 รวมถึงสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 เชื้อแบคทีเรีย

งานวิจัยนี้ใช้แบคทีเรีย ***Pseudomonas aeruginosa*** TISTR 1287 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) นำมาเพิ่มจำนวนเซลล์ในอาหารเหลว (NB) และเก็บรักษาหัวเชื้อ ณ เวลาที่มีอัตราการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง late log phase โดย

เติมกลีเซอรอล ผสมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรเชื้อต่อปริมาตรกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์) เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

2.2 น้ำมันปาล์มและอาหารเลี้ยงเชื้อ

น้ำมันปาล์มที่ใช้ในการทดลองคือ น้ำมันปาล์มยี่ห้อ มรกต นำมาผ่านขั้นตอนการทำให้อนุภาคของน้ำมันแตกตัวก่อน หรือที่เรียกว่า อิมัลชัน (emulsion) ด้วยการทำปฏิกิริยากับ Gum Arabic (GA) ในอัตราส่วน GA 0.30 กรัม ต่อ น้ำมันปาล์ม 1.00 กรัม ก่อนนำไปผสมกันด้วยเครื่อง โฮโมจีไนส์เซอร์ ที่ความเร็วรอบ 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ความดัน 15 บาร์ อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อจะประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป (NB) และอาหารเลี้ยงเชื้อกลุ่มเกลือแร่ (Mineral Salt Medium; MSM) ประกอบด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.00 กรัม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20 กรัม $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.70 กรัม KH_2PO_4 1.50 กรัม $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10.00 กรัม Ferrous ammonium citrate 0.06 กรัม และสารละลายแร่ธาตุ (trace element solution) 1 มิลลิลิตร ทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ซึ่งแร่ธาตุต่างๆ ประกอบด้วย $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.10 กรัม H_3BO_3 0.30 กรัม $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.20 กรัม $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03 กรัม $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02 กรัม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01 กรัม $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร [6] อาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ประเภท ก่อนนำไปใช้จะนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ความดัน 15 บาร์ อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM จะนำไปผสมกับสารละลายน้ำมัน เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

2.3 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ในการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต โดยนำหัวเชื้อที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C นำมากระตุ่นและเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโดยแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตสูงสุดในช่วง late logarithmic phase ระหว่างชั่วโมงที่ 4-36 จากนั้นนำไปหมუნเหวียงเพื่อแยกตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องหมუნเหวียง ที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่ไม่มีคาร์บอนก่อนนำไปใช้ในขั้นตอนการศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต โดยจะทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แบคทีเรียแห้ง (Cell dry weight; CDW) และจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต (Colony Forming Unit; CFU) เพื่อนำไปสร้างกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่าง น้ำหนักเซลล์แบคทีเรียแห้ง กับ จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิต รวมทั้งคำนวณหาปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นที่ใช้ในการทดลองผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

2.4 การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากน้ำมันปาล์ม

ในการทดลองเพื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต โดยการถ่ายสารละลายหัวเชื้อเริ่มต้น ปริมาตร 2.56 มิลลิลิตร (1.75×10^{11} CFUต่อมิลลิลิตร) ลงในอาหาร MSM ที่ผสมกับสารละลายน้ำมัน ปริมาตรรวม 300 มิลลิลิตร ในขวดหมักรูปชมพูขนาด 1 ลิตร โดยแปรผันปริมาณน้ำมันปาล์มที่ใช้ในการทดลอง 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.50, 0.75, 1.00, 1.50 และ 2.00 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ นำไปหมักที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที [5] เป็นเวลา

72 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดต่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง และการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ในการทดลองต่อมา คือการศึกษาช่วงระยะเวลาการหมักที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของ *P. aeruginosa* TISTR 1287 โดยทำการเลือกความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มที่มีผลให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แบคทีเรียแห้งมีค่าสูงสุด แล้วทำการทดลองโดยควบคุมสภาวะแบบเดียวกัน แล้วนำตัวอย่างไปทำการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตตามช่วงระยะเวลาการหมักต่างๆ เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่แบคทีเรียสะสมไว้ในเซลล์

3. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.1 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell dry weight, CDW)

นำตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร ไปหมუნเหวียงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำปราศจากไอออน จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นรวมตะกอนเซลล์แล้วนำไปประเหยแห้งด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ นำไปอบที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก [7]

3.2 การวิเคราะห์ลักษณะการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence Microscope)

ตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร เดิมฟอร์มมาลิน 30 % ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงไป จากนั้นเขย่า 15 ครั้ง แล้วนำไปหมუნเหวียงด้วยเครื่องหมუნเหวียง ที่ความเร็วรอบ

9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำปราศจากไอออน 2 ครั้ง จากนั้น เทน้ำส่วนใสออก นำเซลล์แบคทีเรียไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18°C ในการส่องกล้องตรวจวิเคราะห์ ให้นำตะกอนเซลล์แบคทีเรียมาเสมียร์บนแผ่นสไลด์ ทำให้แห้งและตรึงเซลล์ให้ติดบนสไลด์โดยการผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง จากนั้นหยดสารละลาย Nile red ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ให้ท่วมเซลล์ในที่มีดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างสีออกด้วย DI เบาๆ ซับให้แห้ง ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (glass cover slip) ก่อนนำไปส่องดูการเรืองแสงของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในเซลล์แบคทีเรีย ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence Microscope type 020 518.500 DM/LS II/99) [8] โดยเซลล์แบคทีเรียที่มีการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจะมีการเรืองแสงสีแดงออกมา

3.3 การวิเคราะห์ลักษณะการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM)

ตัวอย่างปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอน เดิมสารละลายกลูตาไรลดีไฮด์ 2.5% ในสารละลายบัฟเฟอร์ (PBS) 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดต่าง 7.4 ไว้ข้ามคืน เพื่อรักษาสภาพเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ตามด้วยการตรึงเซลล์ ด้วยสารละลายออสเมียมเตตรอกไซด์ 1.0% ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อคงสภาพของผนังเซลล์ไว้ แล้วล้างออกด้วยสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ในทุกขั้นตอนจะควบคุมอุณหภูมิที่ 4°C ขึ้นตอนต่อไป

เป็นการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยการแทนที่น้ำด้วยเอทานอล ความเข้มข้นจากน้อยไปมาก ได้แก่ 30, 50, 70, 80, 90, 95 และ 100 % ตามลำดับ ความเข้มข้นละ 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นค่อยๆ แทนที่เอทานอล ด้วยสารละลายผสมระหว่างโพรพิลีนออกไซด์และเอทานอล ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยสารละลายโพรพิลีนออกไซด์บริสุทธิ์ เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C หลังจากนั้นเป็นการแทนที่ด้วยเรซินโดยการเตรียมเรซินที่มีส่วนผสมระหว่างเรซินและสารละลายโพรพิลีนออกไซด์เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 3:1 และ 1:1 ตามลำดับ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องที่อัตราส่วนละ 1 ชั่วโมง และที่อัตราส่วน 1:3 ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาข้ามคืน

ขั้นตอนสุดท้ายเป็นการฝังตัวอย่างเซลล์แบคทีเรียลงในเรซิน โดยนำตัวอย่างใส่ลงในบล็อกพลาสติก แล้วเติมเรซินที่อยู่ในสภาพของเหลวลงในบล็อกดังกล่าว นำไปอบที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 2 วัน และที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 2 วัน ตามลำดับ เพื่อให้เรซินแข็งตัว จากนั้นนำตัวอย่างมาตัดด้วยเครื่องตัดตัวอย่างบางพิเศษ (Ultramicrotome) ด้วยใบมีดแก้ว จากนั้นนำตัวอย่างวางลงบนกริด นำไปเชื่อมด้วยสารละลายเลดซิเตรท (lead citrate) เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นเชื่อมด้วยสารละลายยูเรนิลอะซิเตท (uranyl acetate) ความเข้มข้น 1-2% ในที่มีดเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำกริดที่มีชิ้นตัวอย่างวางบนกระดาษกรองแล้วทำให้แห้ง พร้อมกับทิ้งไว้ 1 คืน ก่อนนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM รุ่น TECNAI 20 TWIN)

3.4 การทำเซลล์แบคทีเรียแห้งเพื่อนำไปสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

นำตัวอย่างในขวดหมัก (อาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อแบคทีเรีย) ไปหมუნเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์แบคทีเรียออก ที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที เทน้ำส่วนใสออก แล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.85 % แล้วนำไปหมუნเหวี่ยง จำนวน 2 ครั้ง ที่สภาวะเดิม จากนั้นนำตะกอนเซลล์ไประเหยน้ำออกจนแห้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง [9] จากนั้นทำให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักจนน้ำหนักคงที่

3.5 การสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตออกจากเซลล์แบคทีเรีย

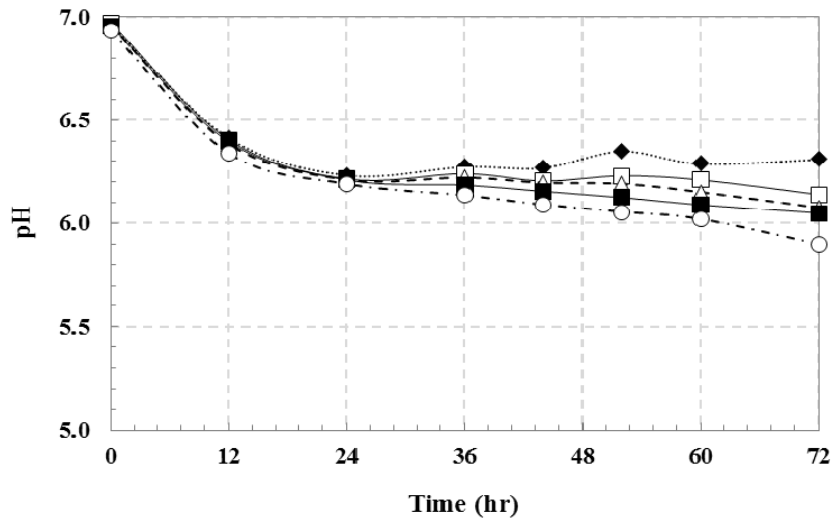
นำตัวอย่างเซลล์แห้งที่ได้จากหัวข้อ 3.4 ปริมาณ 0.40 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมเอทานอล 95% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แช่ตะกอนเซลล์แบคทีเรียไว้ 12 ชั่วโมง แยกส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์แบคทีเรียออกไปใน Cellulose Extraction Thimble แล้วนำไปสกัดอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องสกัดซอกซ์เลต โดยใช้ไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เป็นตัวทำละลาย ทำการสกัดเป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนที่สกัดได้ไประเหยไดคลอโรมีเทนออกจนแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบสุญญากาศ (rotary evaporator) นำขวดกลั่นกลมไปอบที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักจนคงที่ [9] ส่วนที่เหลือในขวดกลั่นกลม คือพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สกัดได้

4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นน้ำมันปาล์มต่อการเจริญเติบโตและการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

4.1.1 ค่าความเป็นกรดต่าง

จากผลการทดลอง พบว่า ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างรวดเร็ว ในทุกความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มในช่วง 6.34-6.40 ในช่วงระยะเวลาการหมัก 12 ชั่วโมงแรก เนื่องด้วยแบคทีเรียมีการย่อยสลายน้ำมันโดยการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ทำให้เป็นกรดไขมันอิสระ โดยมีเอมไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ก่อนจะดูดซึมเข้าสู่เซลล์ เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ซึ่งจะเห็นได้จากน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 2) ทำให้มีค่าความเป็นกรดต่างลดลงอย่างรวดเร็ว [10] จากนั้น ค่าความเป็นกรดต่างในทุกความเข้มข้นจะค่อยๆ ลดลงเรื่อยๆ ในขณะที่ *P. aeruginosa* TISTR 1287 เจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ log phase (12-44 ชั่วโมง) (รูปที่ 2) หลังชั่วโมงการหมักที่ 44 ค่าความเป็นกรดต่างจะอยู่ในช่วงที่ไม่แตกต่างกันมากนัก จนถึงสิ้นสุดการหมัก 72 ชั่วโมง จากงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น มีผลต่อการเจริญเติบโต และการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เนื่องจากมีผลต่อการเข้าถึงสารอาหาร (bioavailability) ของธาตุอาหาร (trace element) [11] การควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อแบคทีเรีย จึงเป็นสิ่งสำคัญ ซึ่งในงานวิจัยนี้ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นอยู่ในช่วง 6.94-6.97 (ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมเท่ากับ 7) ทั้งนี้ค่าความเป็นกรดต่างจะลดลงมากหรือน้อยนั้น จะขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งคาร์บอนและปริมาณความเข้มข้นที่ใช้ในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

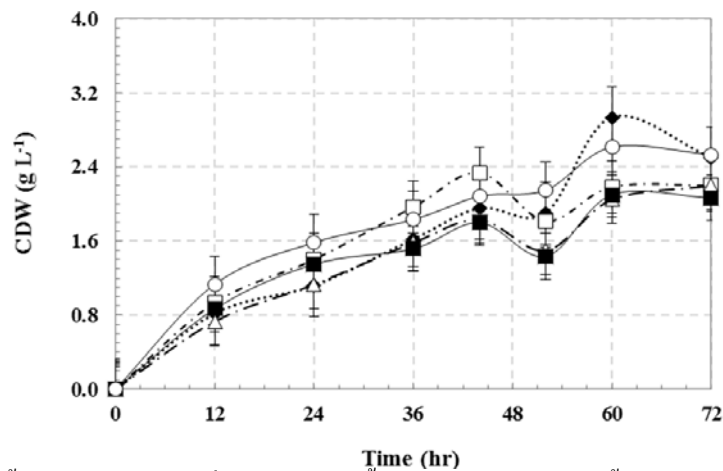


รูปที่ 1 ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นน้ำมันปาล์ม 0.50 (◆), 0.75 (□), 1.00 (△), 1.50 (■) และ 2.00 (○) % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในช่วงระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง

4.1.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง

ความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มนั้น มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *P. aeruginosa* TISTR 1287 โดยน้ำมันปาล์มที่มีความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 2.33 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ความเข้มข้น 0.50, 1.00, 1.50 และ 2.00% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติ ได้แก่ 1.95, 1.83, 1.80 และ 2.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในช่วงระยะเวลาการหมัก 44 ชั่วโมง ซึ่งจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตได้รวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการทำงาน ซึ่งสอดคล้องกับค่าความเป็นกรดต่างที่ลดลงอย่างรวดเร็ว จากนั้น หลังชั่วโมงการหมักที่ 24 แบคทีเรียเริ่มมีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้าลง เห็นได้จากปริมาณน้ำหนักเซลล์ที่ลดลง โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 1.00, 1.50 และ 2.00% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรดต่าง พบว่ายังคงลดลงอย่างต่อเนื่องทำให้สภาวะไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต ทำให้เกิดการขาดความสมดุลระหว่างปริมาณของไฮโดรเจนและไฮดรอกไซด์ไอออนส่งผลต่อการผ่านเข้าออกของสารอาหาร ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ได้ [12] นอกจากนี้จะเห็นได้ชัดที่ความเข้มข้นน้ำมันปาล์ม 2.00 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ มีแนวโน้มสูงขึ้นเพียงเล็กน้อย แต่มีค่าความเป็นกรดต่างลดต่ำลงที่ 6.09 เนื่องจากมีปริมาณน้ำมันมากเกินไป เมื่อเกิดการย่อยสลายน้ำมัน จึงทำให้มีความเป็นกรดมากขึ้น เมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ ซึ่งการที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาวะความเป็นกรดมากเกินไป จะส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียช้าลง เนื่องจากเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต



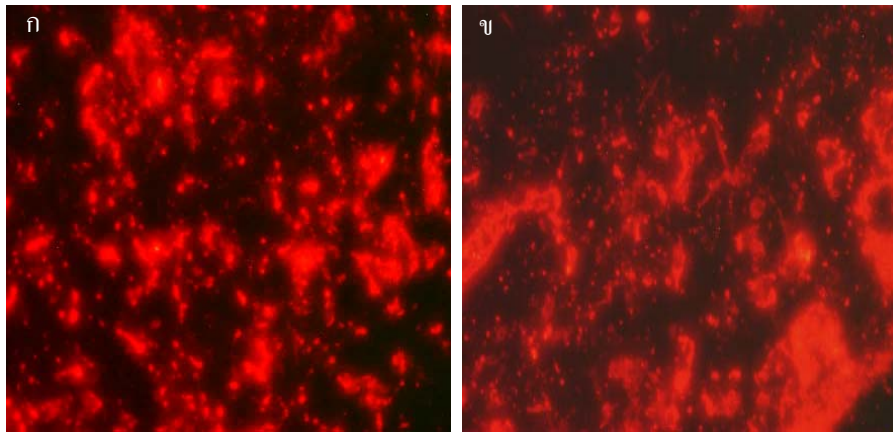
รูปที่ 2 แสดงปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ณ ชั่วโมงการหมักนั้นๆ โดยไม่รวมปริมาณน้ำหนักเซลล์เริ่มต้น ที่ความเข้มข้นน้ำมันปลา 0.50 (◆), 0.75 (□), 1.00 (△), 1.50 (■) และ 2.00 (○) % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในช่วงระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง

ในงานวิจัยนี้ *P. aeruginosa* TISTR 1287 สามารถเจริญเติบโตไปพร้อมกับการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต และสะสมได้สูงสุดเมื่อมีการเจริญเติบโตสูงสุด [2] จากรูปที่ 2 จะเห็นได้ว่าช่วงที่แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตสูงสุด คือในช่วงการหมักที่ 44 ก่อนถึงช่วง stationary phase หลังจากนั้นปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งจะลดลงในช่วงการหมักที่ 56 ในทุกความเข้มข้นของน้ำมันปลา และน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มคงที่จนถึงสิ้นสุดการหมัก จากการทดลองนี้จึงสามารถบ่งชี้ได้ว่าที่ความเข้มข้นน้ำมันปลา 0.75% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับแบคทีเรียในการเจริญเติบโตและสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

4.1.3 การศึกษาการผลิตและสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

การวิเคราะห์การผลิตและสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของแบคทีเรีย โดยการย้อมสีแล้วนำไปส่อง

กล้องนั้น เป็นการวิเคราะห์ผลเบื้องต้นว่า *P. aeruginosa* TISTR 1287 มีการผลิตและสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตอยู่ในตัวเซลล์หรือไม่ โดยแบคทีเรียที่มีการผลิตและสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตไว้ในเซลล์ จะติดสี Nile red ซึ่งเป็นสีย้อมฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent dye) ซึ่งมีความจำเพาะต่อพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต [8] แบคทีเรียที่มีการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในเซลล์ จะมีการเรืองแสงสีแดงสว่างปรากฏออกมาให้เห็นได้ชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 3 โดยการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในเซลล์ *P. aeruginosa* TISTR 1287 ในช่วงการหมักที่ 24 และ 44 มีลักษณะการเรืองแสงที่ไม่แตกต่างกันมากนัก จึงไม่สามารถวิเคราะห์ในเชิงปริมาณได้ว่าแบคทีเรียมีการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในปริมาณมากหรือน้อย แต่สามารถบ่งบอกได้ว่าแบคทีเรียมีการผลิตและสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตไว้ในเซลล์แบคทีเรีย ทั้งนี้จะทำการศึกษาลักษณะของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ผลิตได้ควบคู่ไปด้วย

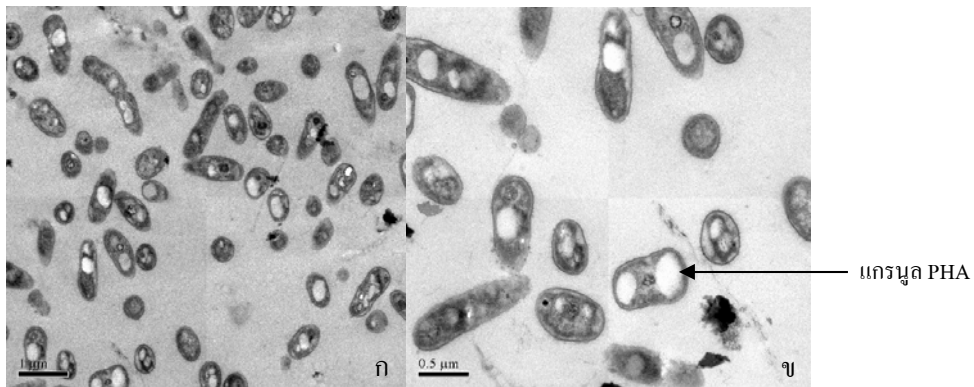


รูปที่ 3 การติดสี Nile red ของ *P. aeruginosa* TISTR 1287 ที่มีการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในเซลล์ ที่ความเข้มข้นน้ำมัน 0.75% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ก) ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง และ (ข) ที่ระยะเวลาการหมัก 44 ชั่วโมง โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์กำลังขยาย 400 เท่า

4.1.4 การศึกษาการผลิตและสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM)

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สะสมอยู่ในตัวเซลล์แบคทีเรีย มีลักษณะเป็นแกรนูลสีขาว 3-5 แกรนูล ขนาดแตกต่างกันดังแสดงในรูปที่ 4 โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.2-0.5 ไมโครเมตร เรียงตัวตาม

ความยาวของตัวเซลล์แบคทีเรียที่เป็นรูปท่อน กระจายอยู่ทั่วไปบริเวณไซโทพลาซึม และพบว่าขนาดของแกรนูลจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต กล่าวคือเมื่อมีการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ปริมาณมาก ขนาดของแกรนูลจะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย และจะเห็นการเรียงแสงสีส้มแดงสว่างที่ซ้อนทับกันของแกรนูล ภายในเซลล์ได้อย่างชัดเจน

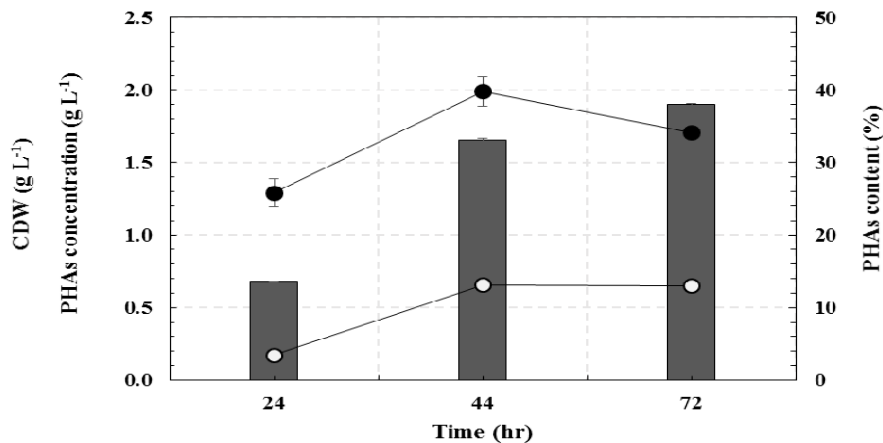


รูปที่ 4 ลักษณะแกรนูลพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สะสมไว้ในเซลล์ของ *P. aeruginosa* TISTR 1287 ที่ความเข้มข้นน้ำมัน 0.75 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ที่กำลังขยาย ก: 2,500 และ ข: 5,000 เท่า

4.2 การศึกษาระยะเวลาการหมักที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

การศึกษาระยะเวลาในการหมักที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตนั้น จะเลือกความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มที่มีปริมาณน้ำหนักรวมสูงสุดคือ 2.33 กรัมต่อลิตร จากผลวิเคราะห์น้ำหนักรวมเซลล์แห้งในหัวข้อ 4.1.2 และให้ผลผลิตสูงสุดในชั่วโมงการหมักที่ 44 ที่ความเข้มข้น 0.75% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แต่ยังไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่าเป็นความเข้มข้นที่ดีที่สุด เนื่องจากที่ความเข้มข้นอื่นๆ มีปริมาณน้ำหนักรวมเซลล์แห้งใกล้เคียงกัน โดยทำการทดลองในตู้บ่มเชื้อที่สภาวะเดิม (30°C 180 รอบต่อนาที) แล้วเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาการหมักที่ 24, 44 และ 72 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ปริมาณน้ำหนักรวมเซลล์แห้งเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว (24 ชั่วโมง) เพิ่มขึ้นสูงสุด (44 ชั่วโมง) และช่วงเวลาดีนสุดกระบวนการหมัก (72 ชั่วโมง) เมื่อพิจารณาจากกราฟน้ำหนักรวมเซลล์แห้งใน

รูปที่ 2 แล้วนำมาทำให้อยู่ในรูปเซลล์แห้งก่อนนำมาสกัด จากการวิเคราะห์พบว่า ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น และสูงสุดที่ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมงเท่ากับ 0.65 กรัมต่อลิตร (38.01%) และในช่วงระยะเวลาการหมัก 24 และ 44 ชั่วโมง มีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต 0.17 (13.59%) และ 0.66 (33.67%) กรัมต่อลิตร (รูปที่ 5) ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ที่ได้มีการศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากน้ำมันเมล็ดในปาล์มที่ผ่านกระบวนการสปอนนิฟิเคชัน ด้วยเชื้อ *Pseudomonas putida* PGA1 [9] พบว่าปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ผลิตได้สูงสุดไม่แตกต่างกัน (37% ของน้ำหนักรวมเซลล์แห้ง) แต่พบว่าผลผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในงานวิจัยนี้ มีปริมาณน้อยกว่าการผลิตจากน้ำมันเมล็ดในปาล์มด้วยเชื้อ *Pseudomonas mosselii* TO7 (47% ของน้ำหนักรวมเซลล์แห้ง) [10]



รูปที่ 5 ปริมาณน้ำหนักรวมเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) (●) ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร) (○) และผลผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (%) (■) ที่สกัดได้ในช่วงระยะเวลาการหมัก 24, 44 และ 72 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นน้ำมันปาล์ม 0.75% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

แต่อย่างไรก็ตาม จากปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ผลิตได้ สามารถบ่งชี้ได้ว่า *P. aeruginosa* TISTR 1287 มีประสิทธิภาพในการผลิตและสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ควบคู่ไปกับการเจริญเติบโต จากรูปที่ 5 จะเห็นได้ว่าในช่วง 44 ชั่วโมงการหมักที่ 44 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สกัดได้ไม่แตกต่างกันกับช่วง 72 ชั่วโมงการหมักที่ 72 สามารถอธิบายได้ว่า แบคทีเรียเจริญเติบโตสูงสุดในช่วง 44 ชั่วโมงการหมักที่ 44 โดยพิจารณาจาก ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงที่สุดจากกราฟ และจะมีการสะสมลดน้อยลงเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Madison and Huisman, 1999 [2] ที่พบว่า *P. aeruginosa* สามารถสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ในระหว่างการเจริญเติบโตและจะสะสมได้น้อยลง หลังจากแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตสูงสุดแล้ว

5. สรุปผล

จากการศึกษาสภาวะที่ใช้ในการเจริญเติบโตของ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1287 พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตสูงสุดในช่วง late logarithmic phase ที่ 24 ชั่วโมง เมื่อนำแบคทีเรียไปศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากน้ำมันปาล์ม พบว่าความเข้มข้นของน้ำมันปาล์ม มีผลต่อการเจริญเติบโต น้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าความเป็นกรดต่าง โดยที่ความเข้มข้น 0.75% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในช่วง 44 ชั่วโมงการหมักที่ 44 เท่ากับ 2.33 กรัมต่อลิตร โดยมีการสะสมแกรนูลพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ไว้ภายในเซลล์ น้ำมันปาล์มที่ความเข้มข้น 0.75% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับ *P. aeruginosa* TISTR 1287 ในการ

เจริญเติบโตควบคู่ไปกับการผลิตและสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ในการทดลองนี้ และจากการศึกษาผลของระยะเวลาในการหมักอาหาร ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น โดยที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง มีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต 0.17 กรัมต่อลิตร (13.59%) และเพิ่มขึ้นสูงสุดจนเริ่มคงที่ที่ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง ปริมาณ 0.65 กรัมต่อลิตร (38.01%)

6. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ (สัญญารับทุนเลขที่ 6144104) ที่ให้ทุนสนับสนุนจนทำให้การวิจัยสำเร็จลุล่วง

7. เอกสารอ้างอิง

- [1] R.M. Lafferty, B. Korsatko and W. Korsatko, "Microbial production of poly-beta-hydroxybutyric acid", Biotechnology special microbial processes, 1988, pp. 136-176.
- [2] L.L. Madison and G.W. Huisman, "Metabolic engineering of poly-beta-hydroxyalkanoate From DNA to plastic", Microbial Molecular Biology Reviews 63, 1999, pp. 21-53.
- [3] M. Lemoigne, "Products de dehydration et de polymerization de acid beta-oxybutyrique", Bull. Soc. Chemistry. Biology 8, 1926, pp. 770.

- [4] B. Fuchtenbusch, D. Wullbrandt and A. Steinbuchel, "Production of polyhydroxyalkanoic acids by **Ralstonia eutropha** and **Pseudomonas oleovorans** from oil remaining from biotechnological rhamnase production", *Apply Microbiology Biotechnology* 53, 2000, pp. 167-172.
- [5] D. Fernandez, E. Rodriguez and M. Bassas, "Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain **Pseudomonas aeruginosa** NCIB 40045: effect of culture conditions", *Biochemistry. Engineering. Journal* 26, 2005, pp. 159-167.
- [6] S.R. Silva-Queiroz, L.F. Silva and J.G.C. Pradella, "PHA (MCL) biosynthesis systems in **Pseudomonas aeruginosa** and **Pseudomonas putida** strains show differences on monomer specificities", *Journal of Biotechnology* 143, 2009, pp. 111-118.
- [7] American Public Health Association, American Water Works Association, "Water Pollution Control Federation, Standard methods for the examination of water and wastewater (2nd Eds.)", American Public Health Association, Washington DC, 1998.
- [8] 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.
- [9] 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", *Apply Microbiology Biotechnology* 47, 1997, pp. 207-211.
- [10] 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.
- [11] 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)
- [12] P. Pornchaloempong, "Triglyceride", Available: <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1001/triglyceride> 2010. (in Thai)
- [13] E. Grothe, M. Moo-Young and Y. Christi, "Fermentation optimization for production of Poly (β -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic", *Enzyme Microbiology Technology* 25, 1999, pp. 132-141.
- [14] G.W. Luli and W.R. Strohl, "Comparison of Growth, acetate production and acetate inhibition of **Escherichia coli** strains in batch and fed-batch fermentations", *Applied Environment Microbiology* 56, 1990, pp. 1004-1011.

- [15] 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.