

ผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่โดยแบคทีเรีย *Cupriavidus necator* ในอาหารเลี้ยงที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

Effects of hydrogen peroxide on polyhydroxybutyrate (PHB) produced by *Cupriavidus necator* grown on glycerol as a carbon source

ณัฐพล ถนงค์ช่างแสง^{1*} วรัญญา ประจําหลัก² อนุสรณ์ หุ่นประดิษฐ์² วิมล ชอบชื่นชม^{1,3} และ
สิทธิรักษ์ รอยตระกูล⁴

Nuttapol Tanadchangsang^{1*} Warunya Prajumluk² Anusorn Hunpradit²
Wimol Chobchuenchom^{1,3} and Sittiruk Roytrakul⁴

^{1*} อาจารย์ประจำ ศูนย์วัสดุชีวภาพเพื่ออุตสาหกรรม วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต จังหวัดปทุมธานี 12000

² ผู้ช่วยวิจัย ศูนย์วัสดุชีวภาพเพื่ออุตสาหกรรม วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต จังหวัดปทุมธานี 12000

³ อาจารย์ประจำ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต จังหวัดปทุมธานี 12000

⁴ นักวิจัย ห้องปฏิบัติการวิจัยโปรตีน โอมิคส์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จังหวัดปทุมธานี 12120

^{1*} Lecturer in Industrial Biomaterials Research Center (IBIOMAT), College of Oriental Medicine, Rangsit University,
Pathum-Thani, Thailand 12000

² Research Associate in Industrial Biomaterials Research Center (IBIOMAT), Rangsit University, Pathum-Thani, Thailand 12000

³ Lecturer in Faculty of Medical Technology, Rangsit University, Pathum-Thani, Thailand 12000

⁴ Researcher in Proteomics Research Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC)
Pathum-Thani, Thailand 12120

* Corresponding author, E mail: nuttapol.t@rsu.ac.th

บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีปริมาณการผลิตพลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้เพิ่มขึ้น โดยการใช้แบคทีเรียในการผลิตจากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันและได้พลาสติกที่มีคุณสมบัติคล้ายกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ ซึ่งพลาสติกชีวภาพที่นิยมผลิตได้แก่ พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้จากกลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ในงานวิจัยนี้จึงได้มีการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Cupriavidus necator* ในกลีเซอรอล และศึกษาผลของการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เมื่อนำเซลล์ที่ได้มาสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและวิเคราะห์โดยเทคนิค Gas chromatography พบว่าเซลล์ที่มีการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีการสะสม PHB สูงขึ้นเป็น 86.9 % w/v ในขณะที่เซลล์ที่ไม่มีการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีการสะสม PHB เพียง 66.9 % w/v เท่านั้น ซึ่งแสดงว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ช่วยเพิ่มความเครียดให้แก่เซลล์ ทำให้เซลล์สามารถผลิต PHB ได้มากขึ้น นอกจากนี้ การเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากกว่า 15 mM ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นประมาณ 6 เท่า จึงสรุปได้ว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีผลทำให้เกิดสาร

Reactive Oxygen Species (ROS) ซึ่งช่วยสนับสนุนให้เซลล์สามารถผลิตสารบางชนิดที่มีผลทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตมากขึ้น

คำสำคัญ: พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต กลีเซอรอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ *Cupriavidus necator*

Abstract

Nowadays, production of biodegradable bioplastics has been considerably increased. The bioplastics can be produced by using bacteria supplemented with various carbon sources in order to obtain the polymer material properties similar to the synthetic polymers. Polyhydroxybutyrate (PHB) is now the most common bio-based plastics in the market. PHB can be synthesized from crude glycerol which is a by-product from biodiesel production process. Thus, in this research, we focused on the effect of hydrogen peroxide addition on PHB formation, produced by *Cupriavidus necator* grown on glycerol as a whole carbon source. Then, the cells were extracted by chloroform and characterized by gas chromatography technique. The results showed that the bacterial cells with hydrogen peroxide addition gave rise on PHB accumulation up to 86.9 % w/v, while the cells without hydrogen peroxide addition accumulated PHB only 66.9 wt% . This result indicated that hydrogen peroxide had increased the stress of cells, enabling the increment of the PHB accumulation. In addition, the concentration of hydrogen peroxide over 15 mM addition has substantial effect on the cell growth approximately 6 folds higher compared to the initial. This can be concluded that hydrogen peroxide affected the generation of the Reactive Oxygen Species (ROS) chemicals, promoting cell production of some intermediate metabolites that result in the increase of the bacterial cell growth.

Keywords: Polyhydroxybutyrate, Glycerol, Hydrogen peroxide, *Cupriavidus necator*

1. บทนำ

Polyhydroxybutyrate (PHB) ที่ถูกสร้างขึ้นจากจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ เพื่อกักเก็บคาร์บอนและพลังงาน เป็นสารพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ถูกนำมาใช้ทดแทนพลาสติกที่ได้มาจากพอลิเมอร์สังเคราะห์จากปิโตรเลียม (Chen, 2009; Lee, 1996; Witholt and Kessler, 1999) เนื่องจากมีคุณสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์บางประการ เช่น ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ เข้ากันได้กับธรรมชาติ ทนทานต่อน้ำ และการซึมผ่านของออกซิเจน PHB สามารถนำไปใช้ทำบรรจุภัณฑ์ที่ใช้งานได้ทั้งได้หลากหลายชนิดและอาจจะมีประโยชน์อย่างสูงในการนำไปประยุกต์ใช้ทาง

การเกษตรและทางการแพทย์อีกด้วย (Chen and Wu, 2005; Williams et al., 1999; Zinn et al., 2001) Poly(3-hydroxybutyrate) หรือ PHB เป็น ไบโอฟอสเฟสเทอร์ที่ได้รับความนิยมแพร่หลายที่สุด และถูกสังเคราะห์โดยจุลินทรีย์หลากหลายชนิดในธรรมชาติ (Lenz and Marchessault, 2004; Sudesh et al., 2000)

แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่สามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายในการผลิต PHB ได้ วัตถุดิบคาร์บอนที่เหมาะสมและราคาค่อนข้างได้รับการพิจารณาเพื่อให้ได้ผลผลิต PHB ต่อราคาต้นทุนที่ต่ำที่สุด กลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซลซึ่งเป็นเศษเหลือใช้ เป็นแหล่งคาร์บอน

ราคาไม่แพงเหมาะสำหรับการนำไปใช้เป็น สารตั้งต้น และวัตถุดิบ (da Silva et al., 2009; Dellomonaco et al., 2010; Yazdani and Gonzalez, 2007) น้ำมันและไขมัน ที่ได้จากพืช สัตว์และสาหร่ายยังคงเป็นทรัพยากรหลักของการผลิตไบโอดีเซล โดยเฉพาะในรูปแบบผลผลิตพลอยได้จากการผลิตอาหารแปรรูปและการเกษตร โดยทุกๆ 100 กิโลกรัมของไบโอดีเซลที่ผลิตขึ้นได้ผ่านกระบวนการทรานส์เอสเตอร์ฟิเคชัน จะเกิดผลพลอยได้เป็นกลีเซอรอลประมาณ 10 กิโลกรัม โดยกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลนี้ มีกลีเซอรอลอยู่ประมาณ 85% (Choi, 2008; Yazdani and Gonzalez, 2007) เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนที่พบทั่วไปซึ่งใช้ต้นทุนการผลิต PHB ก่อนข้างสูงทำให้เป็นอุปสรรคในการนำมาสู่กระบวนการผลิต เช่น กลูโคส (Ryu et al., 1997) ซูโครส (Wang and Lee, 1997) และหางนม (ความสามารถในการละลายต่ำของ แล็กโทส) (Ahn et al., 2000; Wong and Lee, 1998) แล้วการผลิตพลาสติกชีวภาพ PHA จากกลีเซอรอลดิบจะเป็นวิธีที่ดีวิธีหนึ่งในการใช้ประโยชน์ของเสียอุตสาหกรรมและลดต้นทุนการผลิต PHB ลงได้อีกด้วย ด้วยความนิยมที่เพิ่มขึ้นในวงการอุตสาหกรรมไบโอดีเซลจึงเป็นที่คาดว่าจำนวนกลีเซอรอลที่เพิ่มขึ้นจะสามารถนำไปใช้ได้และช่วยให้พลาสติก PHB มีตลาดที่มีศักยภาพขนาดใหญ่เพื่อตอบสนองกำลังการผลิตไบโอดีเซล อย่างไรก็ตามที่ กลีเซอรอลไม่ได้เป็นแหล่งคาร์บอนที่เป็นที่นิยมสำหรับการผลิต PHB เพราะยังไม่มีความชัดเจนว่า PHB จากกลีเซอรอลจะเป็นวัตถุดิบมีคุณสมบัติเหมาะสมแก่การนำไปใช้เชิงพาณิชย์ได้

จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า PHB ถูกผลิตออกมาของ Ashby, Cavalheiro, Ibrahim, Zhu และคณะ เมื่อ *Cupriavidus necator* (formerly *Ralstonia eutropha*), *Zobellella denitrificans*, *Pseudomonas oleovorans*, และ *Burkholderia cepacia*

เจริญเติบโตในกลีเซอรอล ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว (Ashby et al., 2011; Cavalheiro et al., 2009; Ibrahim and Steinbuchel, 2009; Zhu et al., 2010) แบคทีเรีย *C. necator* เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHB ได้และสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด เช่น ฟรักโทสกลูโคส กลีเซอรอล น้ำมันพืช และกรดแลวลินิก ในการเจริญเติบโตของเซลล์ และการสังเคราะห์ PHB (Budde et al., 2011; Cavalheiro et al., 2009; Kim et al., 1994; Sugimoto et al., 1999; Tanadchangsang et al., 2009; Yu, 2010) *C. necator* สามารถสะสม PHB สูงสุดถึง 70% ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ภายใต้เงื่อนไขสารอาหารที่เหมาะสม การขาดสารอาหารในการเจริญเติบโตจะเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิต PHB ภายใต้ภาวะสารอาหารจำกัด ได้แก่ ไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส, แมกนีเซียม, และ ซัลเฟอร์

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นสารที่มีแนวโน้มที่สามารถกระตุ้นให้แบคทีเรียเกิดความเครียดซึ่งอาจจะก่อให้เกิด Reactive Oxygen Species ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์แรงสูงที่มีความว่องไว สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ก่อให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบของเซลล์ โดยอาจจะเข้าไปทำลายโปรตีนหรือเอนไซม์บางชนิด ทำให้แบคทีเรียสามารถสร้างสารบางชนิดได้มากขึ้น

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้มีการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Cupriavidus necator* โดยการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและมีการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไป เพื่อนำเซลล์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณการเจริญเติบโตของเซลล์ และปริมาณการผลิตพอลิเมอร์ PHB ด้วยเทคนิค Gas chromatography

2. วัตถุประสงค์

เพื่อเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Cupriavidus necator* จากกลีเซอรอลและเติมไฮโดรเจนเปอร์

ออกไซค์ เพื่อศึกษาผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซค์ต่อการเจริญและการสร้าง PHB ของเชื้อ *Cupriavidus necator*

3. อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

ในงานวิจัยนี้ใช้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *C. necator* (ATCC 17699) เพื่อใช้ในการศึกษา เตรียมเชื้อแบคทีเรีย โดยนำเชื้อที่ทำการเก็บไว้มาทำการ streak บนอาหาร nutrient agar (NA) ที่ประกอบด้วย peptic digest of animal tissue 5.0 กรัม ต่อ ลิ ต ร sodium chloride 5.0 กรัมต่อลิตร Beef extract 1.5 กรัมต่อลิตร yeast extract 1.5 กรัมต่อลิตร และ agar 15.0 กรัมต่อลิตร (pH 7.4) ที่เตรียมในงานเพาะเลี้ยงเชื้อ เพื่อแยกโคโลนีเดี่ยว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อได้โคโลนีเดี่ยวแล้ว นำ loop เชี่ยเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ใส่ลงไปอาหาร nutrient broth (NB) peptic digest of animal tissue 5.0 กรัมต่อลิตร Sodium chloride 5.0 กรัมต่อลิตร Beef extract 1.5 กรัมต่อลิตร และ yeast extract 1.5 กรัมต่อลิตร (pH 7.4) ที่เตรียมไว้ในหลอด ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปเข้าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในพลาสติก

ขั้นตอนนี้จะเป็นการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร มีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ สูตร mineral salt medium (MS) 50 มิลลิลิตร พร้อมเติมกลีเซอรอล 10 และ 20 กรัมต่อลิตรกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซค์ความเข้มข้น 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 mM จากนั้นทำการนำเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อที่ 3.1 ลงในอาหารที่เตรียมไว้ โดยเทคนิคปลอดเชื้อ แล้วนำไปเข้าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในอาหารสูตร MS ประกอบด้วย NaH_2PO_4 1.2 กรัมต่อลิตร, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 กรัมต่อลิตร, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 กรัมต่อลิตร, K_2HPO_4 7.34 กรัมต่อลิตร และ trace element solution 1 มิลลิลิตรต่อลิตร ส่วน trace element solution เตรียมโดย $\text{Fe}(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 700 ไมโครโมลาร์, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 17 ไมโครโมลาร์, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 25 ไมโครโมลาร์, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 8 ไมโครโมลาร์, $\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 7.2 ไมโครโมลาร์, และ $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8.3 ไมโครโมลาร์ และเก็บตัวอย่างทุกๆ 24,42,48 และ 60 ชั่วโมง ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำเซลล์ที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dry แล้วนำเซลล์แห้งที่ได้มาใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

3.3 การสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณ PHB

3.3.1 การสกัด PHB ด้วยเซลล์แห้งด้วยคลอโรฟอร์ม

ในขั้นตอนนี้เป็น การสกัดเซลล์แห้งของเชื้อ ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ เริ่มจากนำเซลล์แห้งที่ได้ผ่านการ freeze dry มาแล้ว ชั่งใส่ในหลอดทดลอง ประมาณ 10-50 มิลลิกรัม เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตรและเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 3 % w/v กรดซัลฟูริก พร้อมด้วยกรดเบนโซอิก 10 mg/mL (Internal standard) 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาข้ามคืน หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex นาน 1-4 นาที ติดต่อกัน ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง นำไปกรองโดยใช้ syringe ชุดส่วนคลอโรฟอร์มชั้นล่าง ใส่หลอด vial กรองผ่าน Syringe filter และทำการวิเคราะห์หา PHB ด้วยวิธี gas chromatography (GC)

3.3.2 การตรวจวัดปริมาณ PHB ด้วยเทคนิค Gas Chromatography

ในขั้นตอนนี้จะเป็นการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง GC: Shimadzu GC-174/Japan คอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ HP-5 1 Column โดยกำหนดให้มีค่าต่างๆ สำหรับการตรวจวัดเป็น Oven temperature 100 องศาเซลเซียส Injector temperature 250 องศาเซลเซียส Detector temperature 250 องศาเซลเซียส Calibration range 4.6-45.2 ไมโครกรัม และทำการสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับหาน้ำหนักของ PHB โดยชั่งสารมาตรฐาน PHB แยกต่างกัน 5 ระดับ คือ 3.4, 10.6, 20.4, 30.6 และ 40.4 มิลลิกรัม โดยใช้เครื่องชั่งทศนิยมห้าตำแหน่ง และทำการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มตั้งแสดงข้างต้น นำฉีดเข้าเครื่อง GC ตาม condition ที่ระบุข้างต้น

4. ผลการวิจัย

4.1 ผลการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์

ในขั้นตอนการเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ได้มีการเลี้ยงเชื้อ *Cupriavidus necator* โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและได้มีการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แล้วนำไปวัดการเจริญเติบโตด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร ทุก 24,42,48 และ 60 ชั่วโมง (ตารางที่ 1) เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C.necator* โดยเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน แล้วจึงได้ทำการทดลองเพิ่ม โดยเลือกความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ปริมาณ 5,10 และ 15 mM เพราะเป็นช่วงที่เชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดี พร้อมทั้งเลี้ยงที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่แตกต่างกันด้วย และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ที่เวลา 24, 42, 48 และ 60 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ของเชื้อ *Cupriavidus necator* ที่เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร			
	24h	42h	48h	60h
Glycerol 10 g/l	18.4	26.3	44.1	41.1
Gly 10 g/l+ H_2O_2 1 mM	15	23.5	42.1	39.9
Gly 10 g/l+ H_2O_2 3 mM	14.7	22.7	35.9	34.3
Gly 10 g/l+ H_2O_2 5 mM	17.8	26.3	37.9	33.9
Gly 10 g/l+ H_2O_2 10mM	15	22.8	38.5	37.1
Gly 10 g/l+ H_2O_2 15mM	4.4	6.5	32.2	36.9
Gly 10 g/l+ H_2O_2 20mM	4.8	7.2	33.2	37.2
Gly 10 g/l+ H_2O_2 25mM	4.9	6.8	30.5	38.1
Gly 10 g/l+ H_2O_2 30mM	4.3	5.2	26.3	31.9

ตารางที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ของเชื้อ *Cupriavidus necator* ในสภาวะที่เติม กลีเซอรอล และ/หรือ H_2O_2 ที่สภาวะต่างๆกัน

ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร			
	24h	42h	48h	60h
Glycerol 10 g/l	9.48	16.0	16.8	13.9
Glycerol 20 g/l	10.22	40.6	42.2	37.1
Glycerol 40 g/l	10.12	44.3	49.3	62.3
Gly 20 g/l+ H_2O_2 5 mM	7.56	30.1	28.2	26.3
Gly 20 g/l+ H_2O_2 10mM	3.52	35.2	36.9	36.1
Gly 20 g/l+ H_2O_2	1.88	24.3	27.3	29.4

15mM				
*Glycerol 10 g/l (5 ครั้ง)	8.34	39.0	44.6	60.4
**Gly 10 g/l + H ₂ O ₂	8.90	28.8	36.1	45.4
2.5 mM (5 ครั้ง)				
***Gly 20 g/l + H ₂ O ₂	10.86	38.2	37.1	36.1
5 mM (5 ครั้ง)				

*เติมกลีเซอรอลปริมาณ 10 g/L เป็นจำนวน 5 ครั้ง ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง
 **เติม H₂O₂ ปริมาณ 2.5 mM เป็นจำนวน 5 ครั้ง ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง
 ***เติม H₂O₂ ปริมาณ 5 mM เป็นจำนวน 5 ครั้ง ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง
 ****ตัวอย่างอื่นๆเติมกลีเซอรอล และ/หรือ H₂O₂ ที่เวลาเริ่มต้น 0 ชั่วโมง

4.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ PHB ด้วยเทคนิค GC

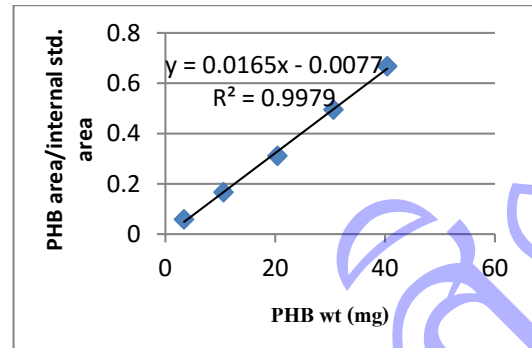
4.2.1 ผลการสร้างกราฟมาตรฐาน

ในการทดลองนี้มีการสร้างกราฟมาตรฐาน โดยนำเอาสารมาตรฐานที่เตรียมไว้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gas chromatography (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การตรวจวัด peak area ของ PHB ที่มีน้ำหนักต่างๆ ด้วยเครื่อง GC สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐาน

PHB wt.(mg)	PHB peak area	Internal std. peak area	PHB peak area / Internal std. peak area
3.4	389.8	6660.9	0.059
10.6	1086.8	6521.5	0.167
20.4	2162.9	6949.9	0.311
30.6	2871.2	5800.2	0.495
40.4	3610.6	5408	0.668

จากนั้นทำการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง PHB wt.(mg) (แกน X) กับ PHB peak area / internal standard peak area (แกน Y) แสดงสมการเส้นตรง ดังรูปที่ 1 เพื่อใช้สำหรับการหาน้ำหนักของ PHB

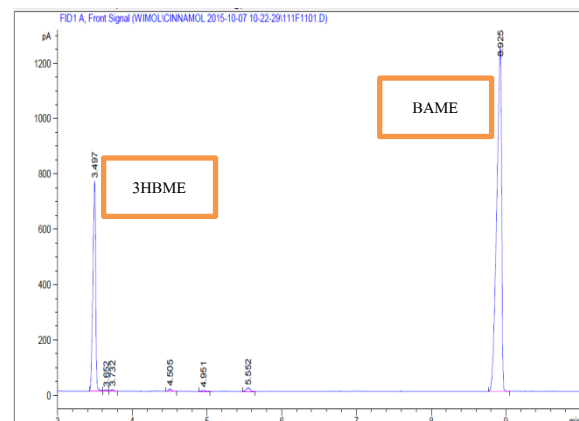


รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานระหว่าง PHB wt.(mg) (แกน X) กับ PHB peak area/internal standard peak area (แกน Y)

4.2.2 การคำนวณหาร้อยละของน้ำหนัก PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง (%)

เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณ PHB ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) ผลที่ได้จะแสดงออกมาในรูปของกราฟ (รูปที่ 2) ซึ่งจะบอกค่าสารที่ต้องการหาออกมาในช่วงเวลาที่เท่าไร (Retention time) แล้วนำพื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area) ที่ช่วงเวลานั้นๆมาคำนวณหาปริมาณ PHB ดังสมการต่อไปนี้

$$PHB(wt\%) = PHB(mg) \times 100 / \text{น้ำหนักเซลล์แห้ง}(mg)$$



รูปที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) โดย 3HBME (3-hydroxyxybutyrate methyl ester) คือ PHB ที่ต้องการหา ส่วน BAME คือ (Benzoic acid methyl ester) ซึ่งใช้เป็น internal standard

จากการศึกษาการตรวจวัด peak area ของ PHB ที่มีน้ำหนักต่างๆ ด้วยเครื่อง GC และนำข้อมูลสร้างกราฟมาตรฐาน พบว่า peak area ของ PHB จะแปรผันตรงกับน้ำหนักของ PHB และมีค่า R² เท่ากับ 0.9979

ตารางที่ 4 แสดงผลการวัดปริมาณ PHB ของเชื้อ *Cupriavidus necator* ที่ช่วงเวลาต่างๆ

ตัวอย่าง	PHB wt %			
	24h	42h	48h	60h
Glycerol 10 g/l	52.5	58.2	66.9	60.2
Gly 10 g/l+H ₂ O ₂ 1 mM	49.5	77.2	80.5	60.8
Gly 10 g/l+H ₂ O ₂ 3 mM	30.7	73.9	67.3	59.1
Gly 10 g/l+H ₂ O ₂ 5 mM	39.4	57.9	47.4	54.7
Gly 10 g/l+H ₂ O ₂ 10mM	23.4	86.9	65.0	54.6
Gly 10 g/l+H ₂ O ₂ 15mM	11.2	52.9	53.2	57.6
Gly 10 g/l+H ₂ O ₂ 20mM	21.6	51.1	58.9	62.6
Gly 10 g/l+H ₂ O ₂ 25mM	9.9	58.1	43.5	61.7
Gly 10 g/l+H ₂ O ₂ 30mM	13.6	48.8	60.5	51.2

ตารางที่ 5 แสดงผลการวัดปริมาณ PHB ของเชื้อ *Cupriavidus necator* ที่ช่วงเวลาต่างๆ

ตัวอย่าง	PHB wt %			
	24h	42h	48h	60h
Glycerol 10 g/l	11.4	41.4	51.2	38.5
Glycerol 20 g/l	32.2	63	57	66.4

Glycerol 40 g/l	45.1	67	47.8	85.4
Gly 20 g/l+H ₂ O ₂ 5 mM	21.1	60	52.6	62.1
Gly 20 g/l+H ₂ O ₂ 10mM	32.8	56.6	66.1	74.8
Gly 20 g/l+H ₂ O ₂ 15mM	6.6	40.7	54.7	66.2
*Glycerol 10 g/l	20.8	56.3	66.4	57.8
**Gly 10 g/l + H ₂ O ₂ 2.5 mM	17.3	54	64.9	78.1
***Gly 20 g/l + H ₂ O ₂ 5 mM	24.1	68.8	70	70.8

*เติมกลีเซอรอลปริมาณ 10 g/L เป็นจำนวน 5 ครั้ง ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

**เติม H₂O₂ ปริมาณ 2.5 mM เป็นจำนวน 5 ครั้ง ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

***เติม H₂O₂ ปริมาณ 5 mM เป็นจำนวน 5 ครั้ง ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

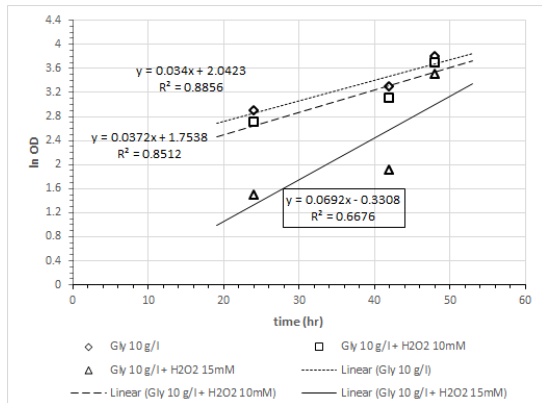
****ตัวอย่างอื่นๆเติมกลีเซอรอล และ/หรือ H₂O₂ ที่เวลาเริ่มต้น 0 ชั่วโมง

จากตารางที่ 4 และ 5 สามารถอธิบายได้ว่าที่ 42 ชั่วโมง จะมีค่า PHB wt% เพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่าในตัวอย่างที่มีการเติม H₂O₂ 1-5 มิลลิโมล และที่ H₂O₂ 10-30 มิลลิโมล จะเพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่า จาก 24 ชั่วโมงแรก และเมื่อพิจารณา ค่า PHB wt% ที่ 42, 48 และ 60 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันเล็กน้อย

4.3 การคำนวณหาอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) อัตราการเติบโตของเซลล์ และอัตราการผลิต PHB

4.3.1 การคำนวณหาอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ)

จากการทดลองได้นำค่า ค่าที่ได้จากตารางที่ 1 และ 2 มาสร้างกราฟโดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า ln OD กับเวลา ดังแสดงในกราฟ รูปที่ 3 และในตารางที่ 6



รูปที่ 3 กราฟระหว่าง ln(OD) และ ระยะเวลาในช่วงของการเติบโตของเชื้อ *Cupriavidus necator* อย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง สำหรับประมาณค่าอัตราการเติบโตเฉพาะ (slope) ของตัวอย่างที่มีแนวโน้มที่ถูกผลกระทบจากการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ตารางที่ 6 ค่าอัตราการเจริญเติบโตเฉพาะ (μ) ของตัวอย่างที่มีแนวโน้มที่ถูกผลกระทบจากการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ตัวอย่าง	μ (hr ⁻¹)	μ (min ⁻¹)
Glycerol 10 g/l	0.034	2.04
Gly10 + H ₂ O ₂ 10mM	0.037	2.22
Gly10 + H ₂ O ₂ 15mM	0.069	4.14

จากตารางที่ 6 พบว่า ค่าอัตราการเติบโตเฉพาะ (μ) ของ Gly 10 กรัม/ลิตร, Gly 10 กรัม/ลิตร กับ H₂O₂ 10 มิลลิโมล และ Gly 10 กรัม/ลิตร กับ H₂O₂ 15 มิลลิโมล คือ 2.04, 2.22 และ 4.14 min⁻¹ ตามลำดับ

4.3.2 การคำนวณหาอัตราการเติบโตและอัตราการผลิต PHB

จากการทดลองได้คำนวณหาอัตราการเติบโตและอัตราการผลิต PHB แสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง อัตราการโตของเซลล์ และอัตราการผลิต PHB ของตัวอย่างที่ถูกผลกระทบจากการเติม H₂O₂

เวลา (hr)	ตัวอย่าง	น.น. เซลล์ (g/L)	อัตราการโตของเซลล์ (g/L/hr)	อัตราการผลิต PHB (g/L/hr)
24	Glycerol 10g/l	3.26	0.136	0.015
	Glycerol 20g/l	3.41	0.142	0.046
	Glycerol 40g/l	3.37	0.141	0.063
	Gly10+H ₂ O ₂ 10mM	5.00	0.208	0.049
	Gly10+ H ₂ O ₂ 15mM	1.47	0.061	0.007
	Glycerol 10g/l	5.33	0.127	0.053
42	Glycerol 20g/l	13.53	0.322	0.203
	Glycerol 40g/l	14.77	0.352	0.236
	Gly10+ H ₂ O ₂ 10mM	7.60	0.181	0.157
	Gly10+ H ₂ O ₂ 15mM	2.17	0.052	0.027
	Glycerol 10g/l	5.60	0.117	0.060
	Glycerol 20g/l	14.07	0.293	0.167
48	Glycerol 40g/l	16.43	0.342	0.164
	Gly10+ H ₂ O ₂ 10mM	12.83	0.267	0.174
	Gly10+ H ₂ O ₂ 15mM	10.73	0.224	0.119
	Glycerol 10g/l	4.63	0.077	0.030
	Glycerol 20g/l	12.37	0.206	0.137
	60	Glycerol 40g/l	20.77	0.346
Gly10+ H ₂ O ₂ 10mM		12.37	0.206	0.113
Gly10+ H ₂ O ₂ 15mM		12.30	0.205	0.118

จากตารางที่ 7 แสดงพบว่าในช่วงเวลา 24 – 42 ชั่วโมงที่ Gly 20 และ 40 กรัม/ลิตร มีค่าอัตราการ

เติบโตของเซลล์ และอัตราการผลิต PHB เพิ่มขึ้น 2-3 เท่า แต่ Gly 10 กรัม/ลิตร และ Gly 10 กรัม/ลิตร กับ H_2O_2 10 มิลลิโมล มีค่าแตกต่างกันน้อยมาก และ Gly 10 กรัม/ลิตร กับ H_2O_2 15 มิลลิโมล ที่เวลา 42-48 ชั่วโมงจะมีค่าอัตราการเติบโตของเซลล์ และอัตราการผลิต PHB เพิ่มขึ้น 4 เท่า

5. การอภิปรายผล

ในการทดลองได้มีการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Cupriavidus necator* โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งจากตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่า ที่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 10 มิลลิโมล ที่เวลา 42 และ 48 ชั่วโมง นั้น เซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นประมาณ 1 เท่า ในขณะที่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 15 มิลลิโมล ที่เวลาเดียวกันนั้น เซลล์มีการเจริญเติบโตมากถึงประมาณ 6 เท่า นั่นอาจจะเป็นเพราะว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปมีผลทำให้เกิด Reactive Oxygen Species (ROS) คือเซลล์เกิดความเครียด ทำให้เซลล์สามารถผลิตสารบางอย่างได้มากขึ้น (Govindasamy et al., 2008) ซึ่งสารที่ผลิตได้อาจจะไปมีผลทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตมากขึ้น และที่ความเข้มข้น 20, 25 และ 30 มิลลิโมล ก็จะพบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเหมือนกัน และผลการวิเคราะห์หาปริมาณ PHB ด้วยเทคนิค Gas chromatography นั้นผลที่ได้ก็แปรผันตรงกับการเจริญเติบโตของเซลล์ และเมื่อกำหนดค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) ของ Gly 10 กรัม/ลิตร, Gly 10 กรัม/ลิตร กับ H_2O_2 10 มิลลิโมล และ Gly 10 กรัม/ลิตร กับ H_2O_2 15 มิลลิโมล คือ 2.04, 2.22 และ 4.14 min^{-1} ตามลำดับ ซึ่งการทดลองในครั้งนี้ยังไม่สามารถที่จะ

บอกได้ จะต้องทำการวิเคราะห์หาโปรตีนที่เกี่ยวข้องด้วยเทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ต่อไป

6. บทสรุป

จากผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 15, 20, 25 และ 30 mM จะเห็นได้ว่าในช่วงระยะเวลาแรกๆเชื้อ *Cupriavidus necator* มีการเจริญเติบโตได้น้อยมากใน 24 ชั่วโมงแรก แต่มีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์การผลิต PHB ด้วยวิธี Gas Chromatography (GC) ค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ ค่าอัตราการเติบโต และ ค่าอัตราการผลิต PHB พบว่าปริมาณ PHB ที่ได้มีค่าแปรผันตรงกับการเจริญเติบโต นั่นคือใน 24 ชั่วโมงแรกเชื้อมีการผลิต PHB ได้น้อย แต่เมื่อเวลาผ่านไปมีการผลิต PHB ได้มากขึ้น (ตารางที่ 3, 4, 5 และ 7) เซลล์ที่มีการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีการสะสม PHB มากถึง 86.9 wt% ในขณะที่เซลล์ที่ไม่มีการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีการสะสม PHB เพียง 66.9 wt% เท่านั้น และมีค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ 2.04, 2.22 และ 4.14 min^{-1} (ตารางที่ 6) ซึ่งการทดลองในครั้งนี้ยังไม่สามารถบอกได้ ต้องทำการทดลองต่อโดยเอาเซลล์ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์หาโปรตีนที่เกี่ยวข้องด้วยวิธีทางโปรตีโอมิกส์ต่อไป

7. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยซึ่งได้รับทุนสนับสนุนประเภททุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ประจำปี 2558 เลขที่ TRG5880069

8. เอกสารอ้างอิง

- Ahn WS, Park SJ, Lee SY. (2000). Production of poly (3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. *Appl Environ Microbiol* 66(8):3624–3627.
- Ashby R, Solaiman D, Strahan G. (2011). Efficient utilization of crude glycerol as fermentation substrate in the synthesis of poly (3 - hydroxybutyrate) biopolymers. *J Am Oil Chem Soc* 88(7):949–959.
- Budde C, Riedel S, Hu^o bner F, Risch S, Popovic^o M, Rha C, Sinsky A. (2011). Growth and polyhydroxybutyrate production by *Ralstonia eutropha* in emulsified plant oil medium. *Appl Microbiol Biotechnol* 89(5):1611–1619.
- Cavalheiro JMBT, de Almeida MCMD, Grandfils C, da Fonseca MMR. (2009). Poly(3 - hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochem* 44(5):509–515.
- Chen G-Q. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHAs) based bio-and materials industry. *Chem Soc Rev* 38:2434–2446.
- Chen G-Q, Wu Q. (2005). The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* 26(33):6565–6578.
- Choi WJ. 2008. Glycerol-based biorefinery for fuels and chemicals. *Recent Pat Biotechnol* 2(3):173–180.
- da Silva GP, Mack M, Contiero J. 2009. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv* 27(1):30–39.
- Dellomonaco C, Fava F, Gonzalez R. (2010). The path to next generation biofuels: Successes and challenges in the era of synthetic biology. *Microb Cell Fact* 9(3):1–15.
- Ibrahim MHA, Steinbu^ochel A. (2009). Poly(3 - hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via high-cell-density fedbatch fermentation and simplified solvent extraction. *Appl Environ Microbiol* 75(19):6222–6231.
- Kim BS, Lee SC, Lee SY, Chang HN, Chang YK, Woo SI. (1994). Production of poly (3 - hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnol Bioeng* 43 (9):892–898.
- Lee SY. (1996). Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol Bioeng* 49:1–4.
- Lenz RW, Marchessault RH. (2004). Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules* 6(1):1–8.
- Ryu HW, Hahn SK, Chang YK, Chang HN. (1997). Production of poly (3 -hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. *Biotechnol Bioeng* 55(1):28–32.
- Sudesh K, Abe H, Doi Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates:

- Biological polyesters. *Prog Polym Sci* 25(10): 1503–1555.
- Sugimoto T, Tsuge T, Tanaka K, Ishizaki A. (1999). Control of acetic acid concentration by pH-stat continuous substrate feeding in heterotrophic culture phase of two-stage cultivation of *Alcaligenes eutrophus* for production of P (3HB) from CO₂, H₂, and O₂ under non-explosive conditions. *Biotechnol Bioeng* 62(6):625–631.
- Tanadchangsang N, Kitagawa A, Yamamoto T, Abe H, Tsuge T. (2009). Identification, biosynthesis, and characterization of polyhydroxyalkanoate copolymer consisting of 3-hydroxybutyrate and -hydroxymethylvalerate. *Biomacromolecules* 10(10):2866–2874.
- Wang F, Lee SY. (1997). Poly (3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. *Appl Environ Microbiol* 63(9):3703–3706.
- Williams SF, Martin DP, Horowitz DM, Peoples OP. (1999). PHA applications: Addressing the price performance issue: I. Tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 25 (1–3):111–121.
- Witholt B, Kessler B. (1999). Perspectives of medium chain length poly (hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Curr Opin Biotech* 10(3):279–285.
- Wong HH, Lee SY. (1998). Poly-(3-hydroxybutyrate) production from whey by high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 50(1):30–33.
- Yazdani SS, Gonzalez R. (2007). Anaerobic fermentation of glycerol: A path to economic viability for the biofuels industry. *Curr Opin Biotech* 18(3):213–219.
- Yu J. (2010). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates from 4-ketovaleric acid in bacterial cells. *Green Polymer Chemistry: Biocatalysis and Biomaterials*, Vol. 1043. Washington DC: American Chemical Society. p. 161–173.
- Zinn M, Witholt B, Egli T. (2001). Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv Drug Deliv Rev* 53(1):5–21.