

การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคานोเอตจากน้ำมันใช้แล้ว โดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน

PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATE FROM USED COOKING OIL BY SOIL-ISOLATED BACTERIA

พรทิพพา พิण्याพงษ์ *

Porn Tippa Pinyaphong *

หลักสูตรเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์

Program of Chemistry Faculty of Science and Technology Uttaradit Rajabhat University

*corresponding author e-mail: p.pinyaphong@gmail.com

(Received: 25 February 2021; Revised: 5 May 2021; Accepted: 7 May 2021)

บทคัดย่อ

พอลิไฮดรอกซีอัลคานอเอต (พีเอชเอ) ถูกสังเคราะห์และสะสมในเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตพีเอชเอได้สูงจากดินที่ปนเปื้อนสารพอลิไฮดรอกซีโอรมาติกไฮโดรคาร์บอน และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชเอ ด้วยยาดิน 3 บริเวณ คือ บริเวณเผาหญ้า บริเวณปนเปื้อนน้ำมันเครื่อง และบริเวณปนเปื้อนสารเคมีทางการเกษตร ถูกนำมาคัดเลือกแบคทีเรียโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral Salt Medium (MSM) ที่มีกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน ทดสอบการสังเคราะห์พีเอชเอเบื้องต้นโดยย้อมสีเซลล์ด้วยสีซูดานแบล็คบี พบว่า สามารถคัดเลือกแบคทีเรียได้ 4 ไอโซเลต จากแบคทีเรีย จำนวน 91 ไอโซเลต แบคทีเรียไอโซเลต SCODw0.2 ที่แยกได้จากดินบริเวณปนเปื้อนน้ำมันเครื่อง สามารถผลิตพีเอชเอได้สูงสุดที่ 0.605 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 55.0 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชเอจากน้ำมันใช้แล้วของแบคทีเรียไอโซเลต SCODw0.2 พบว่า แบคทีเรียสามารถผลิตพีเอชเอได้สูงสุดที่ 0.879 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 68.9 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีน้ำมันใช้แล้วและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ ในอัตราส่วน 100 : 1 พีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 ชั่วโมง องค์ประกอบของพีเอชเอที่แบคทีเรียสังเคราะห์ได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี ประกอบด้วย 3-ไฮดรอกซีโคเดเคโนเอต 3-ไฮดรอกซีเตตระเดเคนอเอต และอื่นๆ เท่ากับร้อยละ 72.94 12.92 และ 14.14 ตามลำดับ

คำสำคัญ: พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ดินที่ปนเปื้อนสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน
แบคทีเรียที่แยกได้จากดิน น้ำมันใช้แล้ว

Abstract

Polyhydroxyalkanoate (PHA) are synthesized and accumulated in bacterial cells to serve as an energy source. The objective of this research was to select bacteria capable of producing high PHA from soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons and to study the optimum conditions for producing PHA. Soil samples of 3 areas: the grass burning area, area contaminated with engine oil and area contaminated with agricultural chemicals were used for screening bacteria through Mineral Salt Medium (MSM) with 1%w/v glucose as a carbon source. PHA synthesis was preliminary tested by staining cells with Sudan Black B. It was found that 4 bacterial isolates were selected from 91 bacterial isolates. SCODw0.2 isolated from soil contaminated with engine oil was able to produce the highest PHA at 0.605 g/L (55.0% of dry cell weight). The optimum conditions of PHA synthesis from used cooking oil by SCODw0.2 were investigated. It was found that this isolate bacterium could produce highest PHA about 0.879 g/l (68.9% of dry cell weight) when cultured in MSM medium containing used cooking oil and ammonium sulphate as carbon source and nitrogen source, respectively, at ratio of 100 : 1, pH 7 and incubated at 35 °C for 60 hours. The composition of PHA that synthesized by bacteria when analyzed by gas chromatography–mass spectrometry was consisted of 3-hydroxydodecanoate, 3-hydroxytetradecanoate and others were 72.94, 12.92 and 14.14 %, respectively.

Keywords: Polyhydroxyalkanoate, Soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, Soil-isolated bacteria, Used cooking oil

บทนำ

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (พีเอชเอ) เป็นสารพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติของเทอร์โมพลาสติก เช่นเดียวกับพอลิเอทิลีนและพอลิโพรไพลีน สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพโดยไม่มีผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม และมีความเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย และมีแนวโน้มที่จะนำมาใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ได้ (Chen, 2009) พีเอชเอสามารถสร้างขึ้นจากแหล่งทรัพยากรหมุนเวียนตามธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ซึ่งสะสมไว้เป็นแหล่งคาร์บอนและ

พลังงาน ภายใต้ภาวะที่จำกัดสารอาหารบางอย่าง เช่น ไนโตรเจน หรือ ฟอสฟอรัส แต่มีปริมาณคาร์บอนมากเกินไป (Kedia et al., 2014)

จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ฟิเอซเอได้จะมีเอนไซม์สำคัญ คือ ฟิเอซเอซินเทส ซึ่งใช้ (R)-3-ไฮดรอกซีเอซิล-โคเอ ((R)-3-hydroxyacyl-CoA) เป็นสับสเตรท โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีวิถีเมแทบอลิซึมในการสร้าง (R)-3-ไฮดรอกซีเอซิล-โคเอ แตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ ดังนั้นฟิเอซเอที่สังเคราะห์จึงมีโครงสร้างหลากหลายและมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และแหล่งคาร์บอน (Tan et al., 2014) แหล่งคาร์บอนที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตฟิเอซเอ ได้แก่ แอซิดคาร์ไรต์ นอร์มอล-อัลเคน นอร์มอล-อัลคานอยด์แอซิด นอร์มอล-อัลกอฮอล์ ก๊าซ (Verlinden et al., 2007) ของเสียชนิดต่างๆ ที่ให้คาร์บอนอิสระ (Koller et al., 2010) เช่น น้ำมันทอดอาหารใช้แล้ว ของเสียน้ำส้มสายชู ของเสียไขมัน เศษอาหาร ของเสียจากการเกษตร น้ำเสีย น้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันพืช กลิเซอรอลดิบจากการผลิตไบโอดีเซล ขยะพลาสติก ก๊าซฟังกาบ เป็นต้น ดังนั้นในการผลิตฟิเอซเอในภาคอุตสาหกรรมควรเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับแหล่งคาร์บอนที่ใช้

ข้อเสียเปรียบที่สำคัญของฟิเอซเอในการผลิตภาคอุตสาหกรรม คือ ต้นทุนการผลิต ซึ่งสูงกว่าต้นทุนในการผลิตพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเลียมอยู่ 5–10 เท่า (Raza, Abid & Banat, 2018) และพบว่า ต้นทุนการผลิตฟิเอซเอร้อยละ 50 มาจากแหล่งคาร์บอนที่ใช้ (Bose et al., 2020) จึงทำให้มีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาการผลิตฟิเอซเอจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นกลุ่มของเสียเพื่อลดต้นทุนในการผลิต (Alvi et al., 2014) อุตสาหกรรมอาหารจานด่วนทำให้เกิดน้ำมันทอดอาหารที่ใช้แล้วจำนวนมากซึ่งน้ำมันเหล่านี้มีความต้องการออกซิเจนทางเคมีและทางชีวภาพสูง จำเป็นต้องมีวิธีการกำจัดที่เหมาะสมก่อนปล่อยทิ้งลงสู่สิ่งแวดล้อม จึงทำให้น้ำมันใช้แล้วเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับการผลิตฟิเอซเอ Haba et al. (2007) ได้ศึกษาถึงการผลิตฟิเอซเอของ *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันทอดอาหารใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนในภาวะจำกัดปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า *P. aeruginosa* 47T2 สามารถผลิตฟิเอซเอได้ร้อยละ 28.2 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และฟิเอซเอที่ผลิตได้ประกอบด้วยมอนเมอร์ 7 ชนิด มอนเมอร์ที่พบมากที่สุด คือ 3-ไฮดรอกซีเดคะโนอิก 3-ไฮดรอกซีโดเดคะโนอิก และ 3-ไฮดรอกซีของกรดไขมันไม่อิ่มตัว เท่ากับร้อยละ 47.8 15.3 และ 26.2 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ Song et al. (2008) ได้ศึกษาการผลิตฟิเอซเอของ *Pseudomonas* sp. DR2 ในอาหารเหลวที่ใช้ไขมันข้าวโพด และน้ำมันทอดอาหารใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน แต่จำกัดปริมาณของฟอสฟอรัส และไนโตรเจน พบว่าเชื้อสามารถผลิตฟิเอซเอได้เท่ากับร้อยละ 37.3 และ 23.5 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียหลายๆ

ชนิดสามารถผลิตฟิเอชเอจากน้ำมันทอดอาหารใช้แล้วได้แต่ผลผลิตที่ได้ยังน้อยกว่าการใช้น้ำมันพืชบริสุทธิ์ (Akaraonye, Keshavarz & Roy, 2010)

น้ำมันทอดอาหารใช้แล้วจะมีคุณสมบัติบางประการที่คล้ายคลึงกับน้ำมันพืชบริสุทธิ์ แต่เนื่องจากการประกอบอาหารด้วยวิธีการทอดจะทำให้ลิพิดที่พบในน้ำมันพืชเกิดปฏิกิริยาเคมี ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่ ไฮโดรคาร์บอน คีโตน แอลดีไฮด์ ออกซิโพรพิลเอสเทอร์ กรดไขมัน โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ กรดคาร์บอกซิลิก สารประกอบไดเมอร์ ดีไฮโดรเมอร์ ไดเมอร์อิมิตัว ไตรเมอร์ และสารประกอบพอลิไซคลิก (Chhetri, Watts & Islam, 2008) ดังนั้น การเลือกแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติที่สามารถเจริญอยู่ในสภาวะจำกัดสารอาหาร และสามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่มีโครงสร้างหลากหลายและซับซ้อนได้ จะช่วยส่งเสริมการเพิ่มปริมาณการผลิตฟิเอชเอจากน้ำมันทอดอาหารได้ โดยพบว่าดินที่ปนเปื้อนสารพอลิไซคลิกอะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นสารที่ประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป และไม่ละลายน้ำ มักพบเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดโดยเฉพาะแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน แล้วนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ (Saadoun, 2002)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกแบคทีเรียจากดินที่ปนเปื้อนสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่มีความสามารถในการผลิตฟิเอชเอ พร้อมทั้งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฟิเอชเอ เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตพลาสติกชีวภาพต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากน้ำมันใช้แล้วโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน มีขั้นตอนดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ 3 แหล่ง ได้แก่ ดินบริเวณที่มีการเผาหญ้า ดินบริเวณที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่อง และดินบริเวณที่ปนเปื้อนสารเคมีทางการเกษตร โดยเก็บตัวอย่างดินแบบ Composite sample เก็บดิน 6 จุดต่อ 1 แหล่ง ที่ความลึก 15.0 เซนติเมตร โดยแต่ละจุดใช้พลั่วขุดหลุมเป็นรูปตัว V ในแนวตั้ง แล้วรวมดินทั้ง 6 จุดเข้าด้วยกัน จากนั้นแบ่งดินบางส่วนลงในถุงพลาสติกประมาณ 1.0 กิโลกรัม เก็บรักษาตัวอย่างดินในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์ ต่อไป (Thuitaisong et al., 2011)

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตฟิเอชเอ

การแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินที่เก็บได้ โดยวิธี Pour Plate technique ด้วยอาหาร Nutrient agar ซึ่งตัวอย่างดิน 1.0 กรัม เติมน้ำละลาย Winogradsky salt (WS) 9 มิลลิลิตร ที่นิ่งฆ่าเชื้อ

แล้ว (WS 1 ลิตร ประกอบด้วย ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.250 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) 0.125 กรัม โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.125 กรัม เพอร์ริกซัลเฟต ($Fe_2(SO_4)_3$) 2.500 มิลลิกรัม และแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) 2.500 มิลลิกรัม) กวนด้วยเครื่องกวนสารละลายที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย WS ที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (สารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้น 10^{-1}) ปิเปตสารละลายซัสเพนชันของเชื้อที่ได้ (10^{-1}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีสารละลาย WS ที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ซัสเพนชันของเชื้อที่ 10^{-2} แล้วทำการเจือจางสารละลายซัสเพนชันของเชื้อที่ได้ต่อไปจนถึง 10^{-10} ปิเปตสารละลายตัวอย่างในแต่ละระดับการเจือจางลงในจานเพาะเชื้อละ 1 มิลลิลิตร (2 ซ้ำ) นำไปบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิของตัวอย่างดินขณะเก็บ) เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำแต่ละโคโลนีมา streak plate บนอาหาร Nutrient agar จนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตฟิเอซเอ โดยเลี้ยงแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ใน Nutrient broth 50 มิลลิลิตร ที่เติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปิเปตสารละลายซัสเพนชันของเชื้อ 5 มิลลิลิตร มาเติมในอาหารเหลว Mineral Salt Medium (MSM) 95 มิลลิลิตร (MSM 1 ลิตร ประกอบด้วย กลูโคส 10.0 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 1.0 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) 6.7 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.2 กรัม แอมโมเนียมเพอร์ริกเซตร ($NH_4FeC_6H_5O_7$) 60 มิลลิกรัม แคลเซียมคลอไรด์เฮปตะไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 7H_2O$) 10.0 มิลลิกรัม และสารละลาย trace element 1 มิลลิลิตร) นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปตรวจสอบการย้อมติดสีแกรม ทดสอบความสามารถในการผลิตฟิเอซเอ โดยการย้อมสีด้วยซูดานแบล็คบี (Sudan Black B) วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งและหาปริมาณของฟิเอซเอที่สังเคราะห์ได้

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันใช้แล้ว

ตัวอย่างน้ำมันทอดอาหารใช้แล้วเก็บรวบรวมจากครัวเรือนในอำเภอลับแล จังหวัดอุตรดิตถ์ นำมาวิเคราะห์ค่าสaponification และองค์ประกอบโดยชั่งน้ำมันใช้แล้ว 40.0 กรัม เติมสารละลายเมทานอลโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลต่อลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปต้มจนกระทั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติมโบรอนไตรฟลูออไรด์เมทานอล (BF_3 -methanol) 5 มิลลิลิตร ต้มต่อไป 2–3 นาที ปลอยสารละลายให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลายผสมของเฮกเซนและสารละลายอิมตัวของโซเดียมคลอไรด์อัตราส่วน 1 : 0.8 โดยปริมาตร ตั้งไว้ให้แยกเป็น 2 ชั้น แยกสารละลายชั้นบนของเฮกเซนที่มีเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันอยู่ เติมแมกนีเซียม

ซัลเฟตแอมโมเนียม 1.0 กรัม กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฟิเอชเอจากน้ำมันใช้แล้ว

ทำการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีอิทธิพลต่อน้ำมันเซลล์แห้งและการผลิตฟิเอชเอของแบคทีเรียจากดินที่สามารถผลิตฟิเอชเอได้สูงสุด ได้แก่ ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน (C : N) ฟิเอช อุณหภูมิ และเวลา โดยศึกษาครั้งละหนึ่งปัจจัย คือ เปลี่ยนแปลงเฉพาะปัจจัยที่ศึกษาในขณะที่ปัจจัยอื่นคงที่ โดยปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ 0.1 0.3 0.5 0.7 0.9 และ 1.0 กรัมต่อลิตร (C : N 100 : 1 33 : 1 20 : 1 14 : 1 11 : 1 และ 10 : 1 ตามลำดับ) ค่าฟิเอชเริ่มต้นของอาหาร คือ 5 6 7 8 และ 9 อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม ได้แก่ 25 35 45 55 และ 65 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ในการบ่ม ได้แก่ 12 24 36 48 60 และ 72 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษา คือ MSM ที่มีน้ำมันใช้แล้วความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 95 มิลลิลิตร เติมน้ำเกลือเริ่มต้นความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ในแต่ละปัจจัยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

5. การวิเคราะห์น้ำมันเซลล์แห้ง

นำสารละลายซัลเฟตของเซลล์ 50 มิลลิลิตร มาเซนตริฟิวจ์ ด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 5 มิลลิลิตร นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเซลล์แห้งและน้ำมันคงที่ ซึ่งน้ำมันเซลล์แห้งที่ได้ (Bhuwal et al., 2013)

6. การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณของฟิเอชเอ

ทำการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณของฟิเอชเอตามวิธีของ ดุษฎี และคณะ (2560) โดยเปิดสารละลายซัลเฟตของเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนสารละลายทิ้งไป เติมน้ำโซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้นร้อยละ 4 โดยปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตะกอนของเซลล์นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายทั้งหมดไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง แล้วล้างต่อด้วยสารละลายผสมของอะซิโตน เมทานอลและไดเอทิลอีเธอร์ ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร ลงในส่วนของตะกอน แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเพื่อให้คลอโรฟอร์มระเหยออกไป จึงเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไป นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 10 นาที นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร แล้วนำไปเทียบกับกราฟ

มาตรฐานของกรดโครโทนิคเพื่อคำนวณหาปริมาณของพีเอชเอและคำนวณร้อยละการสะสมของพีเอชเอ ดังสมการ

$$\text{ร้อยละการสะสมพีเอชเอ} = [\text{ความเข้มข้นพีเอชเอ (กรัมต่อลิตร) / น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)}] \times 100$$

7. การวิเคราะห์องค์ประกอบของพีเอชเอ

แยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงโดยนำสารละลายซัสเพนชันของเซลล์มาเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 20 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดฝาเกลียว เดิมคลอโรฟอรัม 2 มิลลิลิตร และเติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตรในเมทานอล 2 มิลลิลิตร ปิดฝาเกลียวให้แน่น นำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดทิ้งให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนาน 5 นาที ทิ้งให้สารละลายแยกเป็น 2 ชั้น เลือกเก็บชั้นล่างซึ่งเป็นชั้นของคลอโรฟอรัมไว้ในขวดฝาเกลียวขนาดเล็ก ปิดฝาให้แน่น นำไปวิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบของพีเอชเอ โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมตรีภายใต้ภาวะดังนี้ แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด DB-5 อุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์ 80 องศาเซลเซียส แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที อุณหภูมิของ Injector 230 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ Detector (FID) 250 องศาเซลเซียส แก๊สดำพาใช้ฮีเลียม อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรของตัวอย่างที่ฉีดเข้าเครื่อง 1 ไมโครลิตร

ผลการวิจัย

1. ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชเอ

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากดินทั้ง 3 แหล่งในอาหาร Nutrient agar พบว่าแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งมีจำนวนทั้งหมด 91 โคโลนี จำแนกเป็น 35 โคโลนีจากดินบริเวณที่มีการเผาหญ้า (BCD) 33 โคโลนีจากดินบริเวณปนเปื้อนน้ำมันเครื่อง (SCOD) และ 23 โคโลนีจากดินบริเวณปนเปื้อนสารเคมีทางการเกษตร (CSD) หลังจากนำแต่ละไอโซเลตไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Streak plate และนำไปเลี้ยงในอาหาร Nutrient agar ที่เติมกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร พบว่า มีเพียง 4 ไอโซเลตที่สามารถเจริญเติบโตได้ คือ SCODw0.2 SCODy0.2 CSDW และ CSDY ผลการตรวจสอบการย่อยสลาย น้ำหนักเซลล์แห้งและความสามารถในการผลิตพีเอชเอของแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต พบว่า ไอโซเลต SCODw0.2 ที่แยกได้จากดินบริเวณปนเปื้อนน้ำมันเครื่องมีการผลิตพีเอชเอได้มากที่สุด ซึ่งสามารถสะสมพีเอชเอได้ร้อยละ 55.0 โดย

น้ำหนักเซลล์แห้ง ดังตารางที่ 1 ดังนั้นจึงเลือกใช้แบคทีเรียไฮโซเลต SCODw0.2 ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 1 การติดสีแกรมและการสะสมฟิเอชเอของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ไฮโซเลต	การติดสีแกรม	การติดสี	ฟิเอชเอ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง	การสะสมฟิเอชเอ
		Sudan Black B		(กรัมต่อลิตร)	(%)
SCODw0.2	แกรมบวก	สีดำ	0.605±0.030	1.100±0.055	55.0
SCODy0.2	แกรมลบ	สีดำ	0.197±0.010	0.649±0.032	30.3
CSDW	แกรมบวก	สีดำ	0.116±0.006	0.525±0.026	22.1
CSDY	แกรมบวก	สีม่วง	0.159±0.008	0.529±0.026	30.0

2. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฟิเอชเอจากน้ำมันใช้แล้ว

2.1 องค์ประกอบของน้ำมันใช้แล้ว

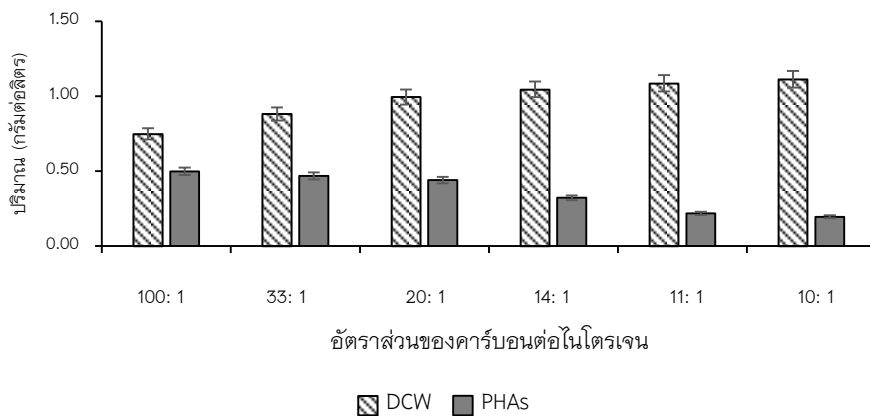
น้ำมันใช้แล้วที่นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งเก็บรวบรวมได้จากครัวเรือน เมื่อนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดไขมันด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรีพบว่า มีกรดไขมันหลักมากที่สุด (ร้อยละ 53.8) รองลงมา คือ กรดโอเลอิก (ร้อยละ 24.1) และกรดปาล์มมิก (ร้อยละ 11.7) ตามลำดับ มีเลขสพอนิฟิเคชัน เท่ากับ 193 และน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยเท่ากับ 870

2.2 ผลการศึกษาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม

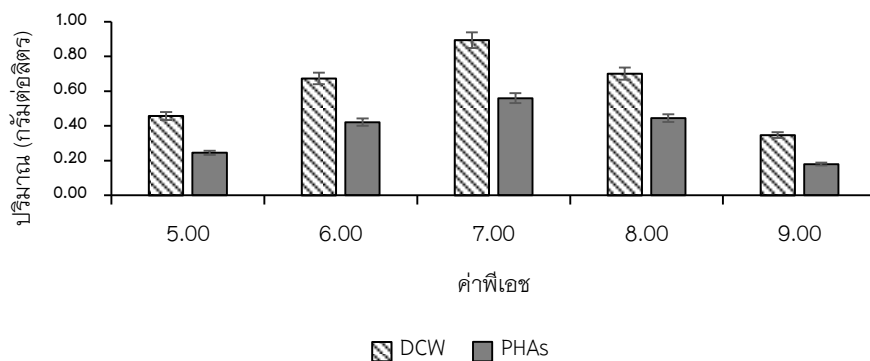
จากการเลี้ยงแบคทีเรียไฮโซเลต SCODw0.2 ในอาหารเหลว Nutrient broth เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว MSM ที่มีน้ำมันใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในอัตราส่วน 10 : 1 ถึง 100 : 1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่ออัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนลดลง ปริมาณเซลล์ของ SCODw0.2 จะเพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณฟิเอชเอที่จุลินทรีย์สามารถผลิตได้จะลดลง ดังภาพที่ 1 โดยที่อัตราส่วน 100 : 1 33 : 1 20 : 1 14 : 1 11 : 1 และ 10 : 1 แบคทีเรียไฮโซเลต SCODw0.2 สามารถผลิตฟิเอชเอได้เท่ากับ 0.499±0.025 0.469±0.023 0.440±0.022 0.322±0.016 0.218±0.010 และ 0.195±0.009 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งร้อยละการสะสมของฟิเอชเอจะแปรผันตามอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ 100 : 1

2.3 ผลการศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชเอ

จากการเลี้ยงกล้าเชื้อของไฮโซเลต SCODw0.2 ในอาหารเหลว MSM ที่มีน้ำมันใช้แล้วและแอมโมเนียมซัลเฟตในอัตราส่วน 100 : 1 เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน และปรับพีเอชของอาหารเหลวให้มีค่าอยู่ระหว่าง 5–9 นำไปหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียไฮโซเลต SCODw0.2 จะผลิตและสะสมพีเอชเอได้สูงสุดที่ 0.590 ± 0.029 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นร้อยละ 66.0 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง) ในอาหารที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 7 ซึ่งตรงกับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลว MSM เมื่อพีเอชของอาหาร MSM มีค่ามากกว่าหรือน้อยกว่า 7 ปริมาณเซลล์และการสะสมพีเอชเอภายในเซลล์มีแนวโน้มลดลง ดังภาพที่ 2 โดยแบคทีเรียไฮโซเลต SCODw0.2 จะผลิตพีเอชเอ ที่พีเอช 5 6 7 8 และ 9 ได้เท่ากับ 0.245 ± 0.012 0.421 ± 0.021 0.590 ± 0.029 0.445 ± 0.022 และ 0.180 ± 0.009 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



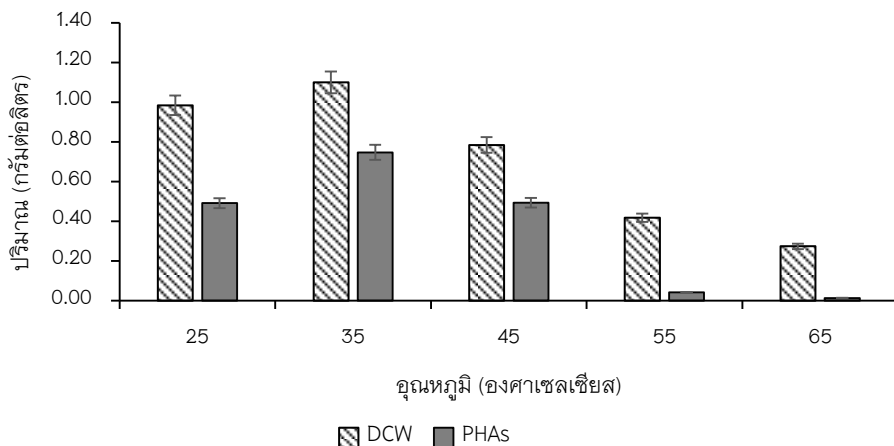
ภาพที่ 1 ปริมาณเซลล์ (DCW) และปริมาณพีเอชเอ (PHAs) ของแบคทีเรียไฮโซเลต SCODw0.2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MSM ที่เปลี่ยนอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน



ภาพที่ 2 ปริมาณเซลล์ (DCW) และปริมาณพีเอชเอ (PHAs) ของแบคทีเรียไฮโซเลต SCODw0.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MSM ที่มีการปรับเปลี่ยนค่าพีเอช

2.4 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชเอ

จากการนำกล้าเชื้อของแบคทีเรียไฮโซเลต SCODw0.2 มาเลี้ยงในอาหารเหลว MSM ที่มีน้ำมันใช้แล้วและแอมโมเนียมซัลเฟตในอัตราส่วน 100 : 1 เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7 แล้วนำไปหมักที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 25 35 45 55 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า SCODw0.2 จะผลิตและสะสมพีเอชเอได้สูงสุดที่ 0.748 ± 0.037 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นร้อยละ 68.0 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียสูงขึ้น ปริมาณเซลล์และการผลิตพีเอชเอมีแนวโน้มลดลง ดังภาพที่ 3 โดยที่อุณหภูมิ 25 35 45 55 และ 65 องศาเซลเซียส แบคทีเรียไฮโซเลต SCODw0.2 ผลิตพีเอชเอได้เท่ากับ เท่ากับ 0.492 ± 0.024 0.748 ± 0.037 0.494 ± 0.025 0.042 ± 0.002 และ 0.014 ± 0.001 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 3 ปริมาณเซลล์ (DCW) และปริมาณพีเอชเอ (PHAs) ของไฮโซเลต SCODw0.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MSM ที่มีการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในการเลี้ยง

2.5 ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชเอ

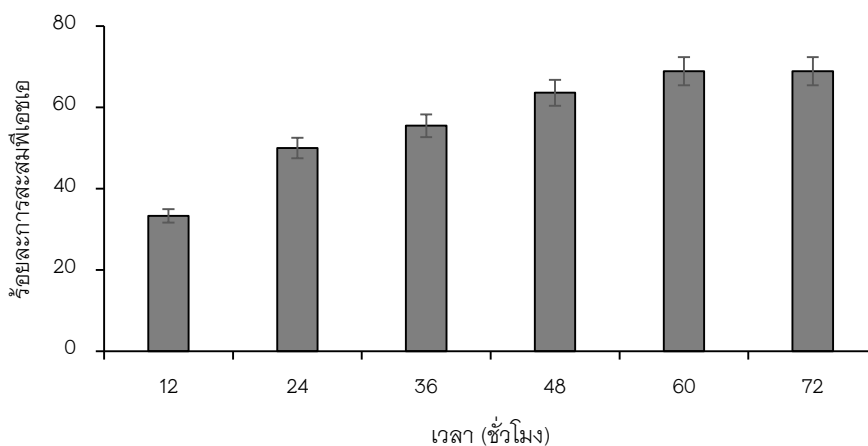
จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิตพีเอชเอของแบคทีเรียไฮโซเลต SCODw0.2 ในอาหารเหลว MSM ที่มีน้ำมันใช้แล้วและแอมโมเนียมซัลเฟตในอัตราส่วน 100 : 1 ค่าพีเอชของอาหาร เท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยเวลาที่ใช้ในการหมัก ได้แก่ 12 24 36 48 60 และ 72 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียไฮโซเลต SCODw0.2 มีแนวโน้มในการเจริญและการผลิตพีเอชเอเพิ่มมากขึ้น เมื่อเวลาในการเลี้ยงเซลล์มากขึ้น ซึ่งสามารถผลิตและสะสมพีเอชเอได้สูงสุดที่ 0.879 ± 0.043 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นร้อยละ 68.9 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่เวลา 60 ชั่วโมง แต่หลังจาก 60 ชั่วโมง แบคทีเรียจะเจริญเติบโตได้ลดลง โดยแบคทีเรียไฮโซเลต SCODw0.2

สามารถผลิตฟิเอชเอได้เท่ากับ 0.200 ± 0.010 0.400 ± 0.020 0.500 ± 0.025 0.700 ± 0.035 0.879 ± 0.043 และ 0.689 ± 0.034 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 24 36 48 60 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อคิดเป็นร้อยละการสะสมของฟิเอชเอ พบว่า ปริมาณฟิเอชเอที่สะสมในเซลล์ที่เวลา 60 และ 72 ชั่วโมง เท่ากัน คือ ร้อยละ 68.9 ดังภาพที่ 4 ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมในการผลิตฟิเอชเอจะเลือกที่ 60 ชั่วโมง

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฟิเอชเอจากน้ำมันใช้แล้วของไอโซเลต SCODw0.2 ได้แก่ อาหารเหลว MSM ที่มีน้ำมันใช้แล้วและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ ในอัตราส่วนเท่ากับ 100 : 1 ฟิเอช 7 บมที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

2.6 ผลการวิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบของฟิเอชเอ

องค์ประกอบของฟิเอชเอที่ผลิตและสะสมอยู่ในเซลล์ของแบคทีเรียไอโซเลต SCODw0.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MSM ที่มีน้ำมันใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยส่วนใหญ่จะเป็นฟิเอชเอที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 5–14 อะตอม ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่กลาง (Medium-chain-length PHAs หรือ mcl-PHAs) ดังตารางที่ 2



ภาพที่ 4 ร้อยละการสะสมฟิเอชเอของไอโซเลต SCODw0.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MSM ที่มีการปรับเปลี่ยนระยะเวลาในการเลี้ยง

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของพีเอชเอที่ผลิตจากเซลล์ของแบคทีเรียโอโซเลต SCODw0.2

DCW (กรัมต่อลิตร)	PHA (กรัมต่อลิตร)	4-HV ^a (%)	3-hydroxyalkanoate, methyl ester (%)				อื่นๆ (%)
			3HO ^b	3HD ^c	3HDD ^d	3HTD ^e	
1.28	0.879	0.59	0.14	1.99	72.94	12.92	14.14

หมายเหตุ: a = 4-ไฮดรอกซีวาลเอร์เรต b = 3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต c = 3-ไฮดรอกซีเดคะโนเอต
d = 3-ไฮดรอกซีโดเดคะโนเอต และ e = 3-ไฮดรอกซีเตตระเดคะโนเอต

อภิปรายผล

การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพีเอชเอจากดินที่ปนเปื้อนสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน 3 แหล่ง ได้แก่ ดินบริเวณเผาหญ้า ดินบริเวณปนเปื้อนน้ำมันเครื่อง และดินบริเวณปนเปื้อนสารเคมีทางการเกษตร โดยใช้อาหารเพื่อการผลิตพีเอชเอที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วทดสอบเบื้องต้นโดยการย้อมชูดานแบล็คปี แบคทีเรียที่มีการสะสมพีเอชเอจะเห็นเป็นจุดสีดำภายในเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Song et al., 2008) พบว่า มีแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชเอได้ 4 โอโซเลต คือ SCODw0.2 และ SCODy0.2 แยกได้จากดินบริเวณปนเปื้อนน้ำมันเครื่อง CSDW และ CSDY แยกได้จากดินบริเวณปนเปื้อนสารเคมีทางการเกษตร แบคทีเรียโอโซเลต SCODw0.2 CSDW และ CSDY มีรูปร่างเป็นแท่งยาวติดกัน ย้อมติดสีแกรมบวก ขณะที่โอโซเลต SCODy0.2 มีรูปร่างเป็นแท่งสั้นและย้อมติดสีแกรมลบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Srilakshmi & Ramachandra (2012) ที่พบว่าแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบสามารถสร้างและสะสมพีเอชเอภายในแกรนูลในเซลล์ เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ ภายใต้ภาวะที่จำกัดสารอาหารบางชนิดและมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไป งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกโอโซเลตที่มีศักยภาพในการผลิตพีเอชเอได้สูงสุดสำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป คือ SCODw0.2 ที่แยกได้จากดินบริเวณปนเปื้อนน้ำมันเครื่องซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Samuel et al. (2019) ที่รายงานว่แบคทีเรียที่แยกได้จากดินปนเปื้อนน้ำมันเครื่องใช้แล้วมีความสามารถทนต่อสภาวะที่มีสารอาหารจำกัดได้สูง และสะสมพีเอชเอเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองของเซลล์ได้ดี เมื่อเลี้ยง SCODw0.2 ในอาหารเหลว MSM ที่มีกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถสังเคราะห์พีเอชเอได้ 0.605 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละในการสะสมเท่ากับร้อยละ 55.0 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งสามารถสังเคราะห์พีเอชเอได้สูงกว่าแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวก เช่น แบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* IAM 12077 ที่สามารถผลิตและสะสมพีเอชเอได้ร้อยละ 24-43 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (Pal et al., 2009)

จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชเอของแบคทีเรียโอโซเลต SCODw0.2 โดยมีน้ำมันใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน มีแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต และแปรผัน

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) เท่ากับ 100 : 1 33 : 1 20 : 1 14 : 1 11 : 1 และ 10 : 1 พบว่า ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฟิเอชเอ คือ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100 : 1 ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Lee et al. (1999) ที่รายงานว่าฟิเอชเอมีการสะสมในแกรนูลของแบคทีเรียภายใต้ภาวะที่มีการจำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ออกซิเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ แมกนีเซียม เป็นต้น และต้องมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไป ในภาวะนี้แบคทีเรียไฮโซเลต SCODw0.2 มีการผลิตฟิเอชเอได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 60 เท่ากับ 0.879 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 68.9 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานการวิจัยของ อัมทิกา เมืองวงษ์ (2553) ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฟิเอชเอของ *Pseudomonas* sp. ASC2 ที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว โดยแปรผันอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน และพบว่า *Pseudomonas* sp. ASC2 สามารถผลิตฟิเอชเอได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 36 เท่ากับร้อยละ 61.8 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ในสภาวะที่ใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 จากผลการวิจัยพบว่า ถ้ามีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนน้อย (มีปริมาณไนโตรเจนมาก) การเจริญเติบโตของแบคทีเรียก็มากขึ้น แต่อัตราการผลิตฟิเอชเอลดลง เพราะแบคทีเรียนำไนโตรเจนไปใช้ในการเจริญเติบโต ส่วนอะเซทิลโคเอถูกนำไปใช้ในวัฏจักรกรดซิตริก จึงทำให้ไม่มีการสร้างและสะสมฟิเอชเอ ดังนั้นแบคทีเรียไฮโซเลต SCODw0.2 จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องถูกจำกัดปริมาณไนโตรเจนแต่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งอาหารในการสังเคราะห์ฟิเอชเอ (วิมล และคณะ, 2558) ในส่วนของการศึกษาค่าฟิเอชเอที่เหมาะสมในการผลิตฟิเอชเอ พบว่า ฟิเอช 7 เป็นฟิเอชที่ทำให้แบคทีเรียไฮโซเลต SCODw0.2 สามารถผลิตฟิเอชเอได้สูงสุด ซึ่งอธิบายได้ว่าในสภาวะที่ฟิเอชน้อยกว่า 7 จะขาดความสมดุลระหว่างปริมาณไฮโดรเจนไอออน และไฮดรอกไซด์ไอออน ส่งผลให้แบคทีเรียไม่สามารถนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ได้ ดังนั้นการปรับฟิเอชเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 7 เป็นการปรับปริมาณไฮโดรเจนอิสระที่แสดงประจุบวกให้ลดลงด้วยไฮดรอกไซด์ซึ่งมีประจุลบ ทำให้ไฮโดรเจนไอออนไม่สามารถส่งผลกระทบต่อเซลล์แบคทีเรียได้ (Du, Si & Yu, 2001) สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตฟิเอชเอของแบคทีเรียไฮโซเลต SCODw0.2 คือ 35 องศาเซลเซียส โดยมีอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนแยกเชื้อ (40 องศาเซลเซียส) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ โสภา (2547) ที่ได้ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตฟิเอชเอด้วยเชื้อผสม พบว่า อุณหภูมิส่งผลต่ออัตราการผลิตและผลผลิตของฟิเอชเอ คือ อัตราการผลิตและผลผลิตฟิเอชเอจะเพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิต่ำ

จากการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของฟิเอชเอที่ผลิตได้ พบว่า ประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ 4-ไฮดรอกซีวาเลอเรต 3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต 3-ไฮดรอกซีเดคะโนเอต 3-ไฮดรอกซีโดเดคะโนเอต และ 3-ไฮดรอกซีเตตระเดคะโนเอต ในปริมาณร้อยละ 0.59 0.14 1.99 72.94 และ 12.92 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบหลักของโมโนเมอร์ที่พบในฟิเอชเอ คือ 3-ไฮดรอกซี

โดเดคะโนเอต และ 3-ไฮดรอกซีเตตระเดคะโนเอต ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Song et al. (2008) ที่รายงานว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ DR2 สามารถผลิตฟิเอซเอจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้วซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ผลิตฟิเอซเอที่ประกอบด้วย 5 โมโนเมอร์ ได้แก่ 3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต 3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต 3-ไฮดรอกซีเดคะโนเอต 3-ไฮดรอกซีเตตระเดคะโนเอต และ 3-ไฮดรอกซีเฮกซะเดคะโนเอต 5.24 45.67 36.74 7.50 5.86 มิลลิเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

พอลิเมอร์ที่ได้จากงานวิจัยนี้จัดเป็นฟิเอซเอที่มีสายโซ่ขนาดกลาง เพราะแต่ละหน่วยโมโนเมอร์ ประกอบด้วย คาร์บอนอะตอม 6–14 อะตอม วิธีหลักในการสังเคราะห์ฟิเอซเอที่มีสายโซ่ขนาดกลางของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารที่มีกรดไขมันเป็นแหล่งคาร์บอน คือ เบต้าออกซิเดชัน ซึ่งสามารถพบได้ในแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *P. oleovorans* *P. fragii* *P. aeruginosa* โดยสังเคราะห์ฟิเอซเอที่มีสายโซ่ขนาดกลางจากกรดแอลคานอิกหรือกรดไขมัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารตั้งต้นในการผลิตมีความเกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ที่ได้ (Kessler & Witholt, 2001) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นศักยภาพของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากดินบริเวณที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่องในการนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตพลาสติกชีวภาพจากน้ำมันใช้แล้ว ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่ราคาถูก

สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐานของการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์ฟิเอซเอของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน 3 แหล่ง คือ ดินบริเวณเผาหญ้า ดินบริเวณปนเปื้อนน้ำมันเครื่อง และดินบริเวณปนเปื้อนสารเคมีทางการเกษตร โดยพบว่าแบคทีเรียไฮโซเลต SCODw0.2 ที่แยกได้จากดินบริเวณปนเปื้อนน้ำมันเครื่องสามารถผลิตฟิเอซเอได้สูงสุด ร้อยละ 68.9 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ในอาหารเหลว MSM ที่มีอัตราส่วนของน้ำมันใช้แล้วต่อแอมโมเนียมซัลเฟต เท่ากับ 100 : 1 ที่มีฟิเอซเริ่มต้นเท่ากับ 7 บมที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตฟิเอซเอของ SCODw0.2 การวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในการนำแบคทีเรียที่แยกได้ไปใช้ในการผลิตฟิเอซเอจากน้ำมันใช้แล้วในระดับถึงหมักต่อไป เพื่อลดต้นทุนของวัตถุดิบในการผลิตฟิเอซเอโดยใช้น้ำมันใช้แล้วและแบคทีเรียตามธรรมชาติที่แยกได้จากดินปนเปื้อนน้ำมันเครื่อง

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม ในการสนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ประสานงาน ขอขอบคุณสาขาวิชาเคมี และสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- คุชฎี มูลดา, สุรัตน์ แซ่โจว, สุทธิชา ณ ระนอง ธรรมสิทธิรงค์, และอานนท์ ธรรมสิทธิรงค์. (2560). การคัดแยกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA จากเชื้อบาซิลลัส. **วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา**, 22, 288–298.
- วิมล ขอบชื่นชม, ลูกมาน สีอวี, และณัฐพล ถนัดช่างแสง. (2558). การแยกและการคัดกรองจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ Polyhydroxybutyrate P(3HB) จากตัวอย่างดินและน้ำในประเทศไทยโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน. ใน **การประชุมวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัยรังสิตประจำปี 2558** (น. 101–108). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยรังสิต.
- โสภา ชินเวชกิจวานิชย์. (2547). **อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตพีเอชเอเชื่อมผสมโดยน้ำเสีย**. (วิทยานิพนธ์ปริญญาคุฎฎบัณฑิต) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะวิศวกรรมศาสตร์.
- อัมทิกา เมืองวงษ์. (2553). **การผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตโดยใช้ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล**. (วิทยานิพนธ์ปริญญาโท) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.
- Akaraonye, E., Keshavarz, T., & Roy, I. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 85, 732–743.
- Alvi, S., Thomas, S., Sandeep, K.P., Kalaalvirikkal, N.J.V., & Yaragalla, S. (2014). **Polymers for packaging application**. New Jersey: Apple Academic Press.
- Bose, S.A., Raja, S., Jeyaram, K., Arockiasamy, S., & Velmurugan, S. (2020). Investigation of fermentation condition for production enhancement of polyhydroxyalkanoate from cheese whey by *Pseudomonas* sp. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, 9(5), 890–989.
- Bhuwal, A.K., Singh, G., Aggarwal, N.K., Goyal, V., & Yadav, A. (2013). Isolation and screening of polyhydroxyalkanoates producing bacteria from pulp, paper, and cardboard industry wastes. **International Journal of Biomaterials**, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/752821>.
- Chen, G.Q. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. **Chemical Society Reviews**, 38, 2434–2446.
- Chhetri, A.B., Watts, C.K., & Islam, R.M. (2008). Waste cooking oil as an alternate feedstock for biodiesel production. **Energies**, 1, 3–18.

- Du, G., Si, Y., & Yu, J. (2001). Inhibitory effect of medium-chain-length fatty acids on synthesis of polyhydroxyalkanoates from volatile fatty acids by *Ralstonia eutropha*. **Biotechnology Letters**, **23**, 1613–1617.
- Haba, E., Vidal Mas, J., Bassas, M., Espuny, M.J., Llorens, J., & Manresa, A. (2007). Poly 3-(hydroxy-alkanoates) produced from oily substrates by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCBIM 40044): effect of nutrients and incubation temperature on polymer composition. **Biochemical Engineering Journal**, **35**, 99–106.
- Kedia, G., Passanha, P., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J., & Esteves, S.R. (2014). Evaluation of feeding regimes to enhance PHA production using acetic and butyric acids by a pure culture of *Cupriavidus necator*. **Biotechnology and Bioprocess engineering**, **19**(6), 989–995.
- Kessler, B., & Witholt, B. (2001). Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. **Journal of Biotechnology**, **86**, 97–104.
- Koller, M., Atlic, A., Dias, M., Reiterer, A., & Braunegg, G. (2010). **Plastics from bacteria: natural functions and application**. Berlin/Heidelberg: Springer.
- Lee, S.Y., Choi, J.L., & Wong, H.H. (1999). Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. **International Journal of Biological Macromolecules**, **25**, 31–36.
- Pal, A., Prabhu, A., Kumar, A.A., Rajagopal, B., Dadhe, K., Ponnamm V., & 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.
- Raza, Z.A., Abid, S., & Banat, I.M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. **International Biodeterioration & Biodegradation**, **126**, 45–56.
- Saadoun, I. (2002). Isolation and characterization of bacteria from crude petroleum oil contaminated soil and their potential to degrade diesel fuel. **Journal of Basic Microbiology**, **42**, 420–428.
- Samuel, M.M., Betty, M.N., Kasili, R., Edward, K.M. & Naumih, N.M. (2019). Production of polyhydroxy-alkanoates by hydrocarbonoclastic bacteria. **African Journal of Biotechnology**, **18**(17), 352–364.
- Song, H.J., Jeon, C.O., Choi, M.H., Yoon, S.C., & Park, W. (2008). Polyhydroxyalkanoate (PHA) production using waste vegetable oil by *Pseudomonas* sp. Strain DR2. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, **18**, 1408–1415.
- Srilakshmi, S., & Ramachandra, R.V.S.C. (2012). Studies on screening isolation and molecular characterization of PHB producing *Staphylococcus* spp. **International Journal of Integrative sciences, Innovation and Technology Section B**, **1**, 24–31.
- Tan, G.A., Chen, C-L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I.M.N., Li, Y., Zhao, L., Mo, Y., & Wang, J-Y. (2014). Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. **Polymer**, **6**, 706–754.

- Thuitaisong, C., Parkpian, P., Shipin, O.V., Shrestha, R.P., Naklang, K., Delaune, R.D., & Jugsujinda, A. (2011). Soil-quality indicators for predicting sustainable organic rice production. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, **42**, 548–568.
- Verlinden, R.A.J., Hill, D.J., Kenward, M.A., Williams, C.D., & Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology**, **102**, 1437–1449.