View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Srinakharinwirot University: SWU e-Journals System

ผลของการเสริมบิวทิเรตต่อการผลิตสารมูลค่าสูงซี–ไฟโคไซยานิน และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตในสไปรูลิน่า พลาเทนซิส

วินัย จรูญไชยพิพัฒน์ นาฏอนงค์ หมุดธรรม อุเทน พรมอริยะ ฉันท์ชนก ดวงศรี คมสัน สัจจะสถาพร สุชนิทธิ์ งามกาละ และวุฒินันท์ รักษาจิตร์*

สาขาวิชาเทคโนโลยีสุขภาพสัตว์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
*E-mail: cvtwnr@ku.ac.th

รับบทความ: 23 มีนาคม 2563 แก้ไขบทความ: 11 มิถุนายน 2563 ยอมรับตีพิมพ์: 1 กรกฎาคม 2563

บทคัดย่อ

สไปรูลิน่า พลาเทนซิสเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงและเจริญได้ในสภาวะที่หลากหลาย สามารถสังเคราะห์สารปฐมภูมิและสารทุติยภูมิที่สำคัญและมีมูลค่าทางเศรษฐกิจได้หลายชนิด เช่น ซี–ไฟโคไซยานิน เพื่อใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตหรือพีเอชบี ซึ่งใช้ผลิตพลาสติกชีวภาพและสามารถทดแทนพลาสติกที่ถูกสังเคราะห์จากกระบวนการทางเคมีได้ในอนาคต ในการศึกษาครั้งนี้การเพาะเลี้ยงในอาหารที่เสริมบิวทิเรตนำมาใช้เพื่อกระตุ้นการเพิ่มการสะสมซี–ไฟโคไซยานินและพีเอชบีของสไปรูลิน่า พลาเทนซิส ผลการศึกษาพบว่า สไปรูลิน่า พลาเทนซิสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวปกติ Zarrouk และเสริมบิวทิเรตความเข้มข้น 0.05%(w/v) เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง มีการสะสมซี–ไฟโคไซยานินเพิ่มสูงขึ้น 3 เท่า ขณะที่สไปรูลิน่า พลาเทนซิสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Zarrouk ที่ขาดไนเตรตและเสริมบิวทิเรตความเข้มข้น 0.05%(w/v) เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง สามารถสะสมพีเอชบีสูงเพิ่มขึ้น 7 เท่า การตรวจสอบโครงสร้างของพีเอชบีที่สกัดได้จากสไปรูลิน่า พลาเทนซิสด้วยเทคนิคฟลูเรียร์ทรานส์ฟอร์ม อินฟราเรดสเปคโทรไมโครสโคปี (เอฟทีไออาร์) สามารถยืนยันว่าสารที่สกัดได้เป็นพีเอชบี ผลการทดลองสรุปได้ว่า การเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่า พลาเทนซิสในอาหารที่เสริมบิวทิเรตกระตุ้นการสะสมซี–ไฟโคไซยานินและพีเอชบีได้สูง

คำสำคัญ: สภาวะที่เสริมบิวทิเรต ซี–ไฟโคไซยานิน พีเอชบี สไปรูลิน่า พลาเทนซิส เอฟทีไออาร์

Effect of Butyrate Supplementation on the Production of a High Value C–phycocyanin and Polyhydroxybutyrate in *Spirulina platensis*

Winai Charunchaipipat, Nat–Anong Mudtham, Authen Promariya, Chanchanok Duangsri, Khomson Satchasataporn, Suchanit Ngamkala and Wuttinun Raksajit*

Program of Animal Health Technology, Faculty of Veterinary Technology, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

*E-mail: cvtwnr@ku.ac.th

Received: 23 March 2020 Revised: 11 June 2020 Accepted: 1 July 2020

Abstract

Spirulina platensis is cyanobacteria that can perform photosynthesis and grows in a variety of habitats. It can synthesize primary and secondary metabolites, which are important and have economic values such as C–phycocyanin, which can be used as a mixture of animal feed and polyhydroxybutyrate or PHB. PHB is used to produce bioplastics and can replace plastics synthesized from chemical processes in the future. In this study, *S. platensis* was cultured in butyrate–supplemented medium to stimulate the increase of cellular C–phycocyanin and PHB accumulation. The results revealed that *S. platensis*, cultured in Zarrouk medium supplemented with 0.05%(w/v) butyrate for 48 hours, increased C–phycocyanin accumulation by 3 times. While *S. platensis* cultured in Zarrouk medium lacking of nitrate and supplementing with 0.05%(w/v) butyrate for 48 hours, it could accumulate higher PHB with 7 times. Structure of the PHB extracted from *S. platensis* was analyzed using the Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), which can be confirmed as PHB. It can be concluded that cultivation of *S. platensis* in butyrate–supplemented medium stimulated the accumulation of C–phycocyanin and PHB.

Keywords: Butyrate–supplied conditions, C–phycocyanin, PHB, *Spirulina platensis*, FTIR

บทนำ

สไปรูลิน่า พลาเทนซิส (*Spirulina platensis*) เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงและเจริญได้ในสภาวะสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย มีรูปร่างลักษณะเป็นเส้นสายที่ขดเป็นเกลียววนซ้าย ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ผิวเซลล์ประกอบด้วยสารจำพวกพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharides) โปรตีน (proteins) และลิพิด (lipids) (Limoli

et al., 2015) สไปรูลิน่า พลาเทนซิสสามารถสังเคราะห์สารปฐมภูมิ (primary metabolites) รวมไปถึงสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่สำคัญและมีมูลค่าทางเศรษฐกิจได้หลายชนิด เช่น ซี–ไฟโคไซยานิน (C–phycocyanin) ซึ่งเป็นโปรตีนรงควัตถุอยู่ภายในเซลล์ของสไปรูลิน่า พลาเทนซิส มีคุณสมบัติสามารถต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลชีพ และยังเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน (Eriksen 2008; Shanmugam *et al*. 2017; Sitohy *et al*., 2015) และพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตหรือพีเอชบี (polyhydroxybutyrate (PHB)) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่ได้จากกรดไขมันภายในเซลล์สไปรูลิน่า พลาเทนซิส มีคุณสมบัติไม่ละลายในน้ำ (Duangsri and Raksajit, 2016; Raza *et al*., 2018; Sanhueza *et al*., 2019) และย่อยสลายได้ด้วยจุลินทรีย์ในดินภายใต้สภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน (Bugnicourt *et al*., 2014; Masood *et al*., 2014) พีเอชบีจึงถูกนำไปใช้ในการผลิตพลาสติกชีวภาพ ในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยอย่างแพร่หลายในการกระตุ้นการสังเคราะห์ซี–ไฟโคไซยานินและพีเอชบีในไซยาโนแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดเรื่องกระบวนการเพาะเลี้ยงและต้นทุนของอาหารเลี้ยง ดังนั้นการเลือกสภาวะการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ จึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจและมีศักยภาพในการพัฒนาสู่เชิงพาณิชย์ จากรายงานก่อนหน้าของ Kuddus *et al*. (2013) พบว่าการเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่า พลาเทนซิส ภายใต้สภาวะแบบให้แสงและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จากธรรมชาติ (photoautotrophic condition) ในบ่อเพาะเลี้ยงกลางแจ้ง สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์ซี–ไฟโคไซยานิน ได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงภายในที่ร่ม การเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะการใช้สารประกอบอินทรีย์คาร์บอนและแสง (mixotrophic condition) พบว่าสไปรูลิน่า พลาเทนซิสสามารถเจริญได้เร็ว มีชีวมวลและปริมาณซี–ไฟโคไซยานินภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้นกว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้ photoautotrophic condition ขณะที่ภายใต้สภาวะการใช้สารประกอบอินทรีย์ (heterotrophic condition) ซึ่งเลี้ยงสไปรูลิน่า พลาเทนซิสในที่มืดและมีการเติมน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโทสเพิ่มในอาหารเลี้ยง พบว่า สไปรูลิน่า พลาเทนซิส เจริญได้ช้าและมีปริมาณซี–ไฟโคไซยานินต่ำกว่าการเลี้ยงทั้งใน photoautotrophic และ mixotrophic condition นอกจากนี้ พบว่าภายใต้ photoautotrophic condition ที่อาหารเลี้ยงขาดแหล่งไนโตรเจน สไปรูลิน่า พลาเทนซิสจะปรับเมแทบอลิซึมใหม่เพื่อรักษาสมดุลภายในเซลล์ เช่น กระตุ้นการย่อยสลายสารประกอบโปรตีนไนโตรเจนภายในเซลล์ และกระตุ้นการเก็บสะสมสารประกอบคาร์บอนที่มีมากเกินพอเพื่อเป็นแหล่งพลังงานสะสมภายในเซลล์ Deschoenmaeker *et al.* (2016) พบว่า *Arthrospira* sp. PCC8005 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยง Zarrouk ที่ขาดไนเตรต ภายใต้ photoautotrophic condition เป็นเวลา 168 ชั่วโมง มีการสะสมพีเอชบีเพิ่มขึ้น 4 เท่า ของอาหารเลี้ยงปกติ ขณะที่ *Synechocystis* sp. PCC6803 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยง BG_{11} ที่ขาดไนเตรตและฟอสเฟต ภายใต้ heterophototrophic condition ซึ่งเติมกลูโคส เป็นเวลา 12 วัน มีการสะสมพีเอชบีได้ 21% ของชีวมวลแห้ง (Monshupanee and Incharoensakdi, 2014) สำหรับแบคทีเรีย *Cupriavidus necator* สามารถผลิตพีเอชบีได้เพิ่มขึ้นมากกว่า 2 เท่า ภายใต้สภาวะ fed–batch fermentation ที่เติมกรดแอซิติกและกรดบิวทิริก เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน (Kedia *et al.* 2014) สำหรับการใช้ประโยชน์ใน

อนาคต การเลือกใช้วัสดุเหลือทิ้งมาเป็นแหล่งอาหารสำหรับจุลินทรีย์ นอกจากจะช่วยลดต้นทุนของอาหารเลี้ยงแล้วยังเป็นการช่วยบำบัดสารตกค้างในสิ่งแวดล้อมด้วย เช่น บิวทิเรต (butyrate) เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนที่สำคัญของจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถพบบิวทิเรตเป็น by–product ในน้ำทิ้งจากการหมักกากน้ำตาลอ้อยหรือน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันมะกอก ดังนั้นหากสามารถนำน้ำทิ้งจากการหมักกากน้ำตาลอ้อยหรือน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันมะกอกที่มีบิวทิเรตเป็นองค์ประกอบดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่า พลาเทนซิสได้ จะเป็นการเพิ่มมูลค่าและลดต้นทุนในการเตรียมอาหารเลี้ยงได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อกระตุ้นการสะสมซี–ไฟโคไซยานินและพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตในเซลล์ของสไปรูลิน่า พลาเทนซิส ภายใต้สภาวะที่เสริมบิวทิเรต

วิธีการดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่า พลาเทนซิส

เพาะเลี้ยงสไปรูลิน่า พลาเทนซิสในอาหารเหลวปกติ Zarrouk (pH 9.0) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ภายใต้แสงปกติโดยมีความเข้มแสง 40 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที และมีการเขย่าตลอดเวลาด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และวัดค่าการเติบโตของเซลล์โดยการวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร (Raksajit *et al*., 2012) ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Genesys 20 ยี่ห้อ Thermo scientific สำหรับการกระตุ้นการสะสมซี–ไฟโคไซยานิน นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวปกติ Zarrouk (pH 9.0) เป็นเวลา 7 วัน (OD_{730}~1.2) จากนั้นนำเซลล์ไปใส่อาหารเลี้ยงอาหารเหลวปกติ Zarrouk (pH 9.0) ที่มีการเสริมบิวทิเรตความเข้มข้น 0.05%(w/v) (Z+Bur) จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับการกระตุ้นการสะสมพีเอชบี นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวปกติ Zarrouk (pH 9.0) เป็นเวลา 7 วัน (OD_{730}~1.2) ไปใส่ในอาหารเลี้ยง Zarrouk (pH 9.0) ที่ขาดไนเตรต (ZN_0) ที่มีการเสริมบิวทิเรตความเข้มข้น 0.05%(w/v) (ZN_0+Bur) จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์มาวิเคราะห์การสะสมซี–ไฟโคไซยานินและพีเอชบี

การวิเคราะห์และหาปริมาณซี–ไฟโคไซยานิน

นำเซลล์แห้งของสไปรูลิน่า พลาเทนซิส 0.5 กรัม ละลายในน้ำปริมาณ 40 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ (sonicator) ที่ความถี่ 20 กิโลเฮิรตซ์ เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนน้ำของสารสกัดโดยการนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยระวังไม่ให้สารสกัดโดนแสงหรือความร้อน จากนั้นวัดการดูดกลืนของสารสกัดที่ความยาวคลื่น 652 และ 615 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Genesys 20 ยี่ห้อ Thermo scientific และคำนวณหาปริมาณของซี–ไฟโคไซยานินด้วยสูตรของ Bennett and Bogorad (1973)

$$PC\ (mg/mL) = \frac{OD_{615} - 0.474(OD_{652})}{5.34}$$

การวิเคราะห์และหาปริมาณพีเอชบีที่สะสมอยู่ภายในเซลล์

ผสมเซลล์สไปรูลิน่า พลาเทนซิสกับสีย้อม nile red บนแผ่นแก้วปิดด้วย cover slip และ

บ่มในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที ตรวจการติดสีของพีเอชบีด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (ZEISS LabA1 AXIO) ที่ความยาวคลื่น 559 นาโนเมตร (emission wavelength) พีเอชบีจะพบลักษณะเป็นแกรนูลสีส้มเหลืองสามารถสังเกตเห็นได้ภายในเซลล์ สำหรับการสกัดพีเอชบี นำเซลล์แห้งของสไปรูลิน่า พลาเทนซิส 0.5 กรัม แช่ในเมทานอลเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น เก็บตะกอน (pellet) ด้วยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำตะกอนมาต้มในคลอโรฟอร์มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นำส่วนใสมาระเหยคลอโรฟอร์มออกจนเกิดตะกอนพีเอชบี จากนั้นล้างตะกอนพีเอชบีด้วยแอซิโตนที่เย็น ระเหยแอซิโตนจนพีเอชบีแห้ง สำหรับการตรวจหาปริมาณพีเอชบีด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) โดยนำเซลล์มาเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตรและต้มที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อเปลี่ยนพีเอชบีไปเป็นกรดโครโทนิค (crotonic acid, Sigma) และตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณพีเอชบีและรายงานผลในหน่วย % dry cell weight (%w/w(dcw)) จากนั้นวิเคราะห์โครงสร้างของพีเอชบีด้วยฟลูเรียร์ทรานส์ฟอร์ม อินฟราเรดสเปคโทรไมโครสโคปี (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)

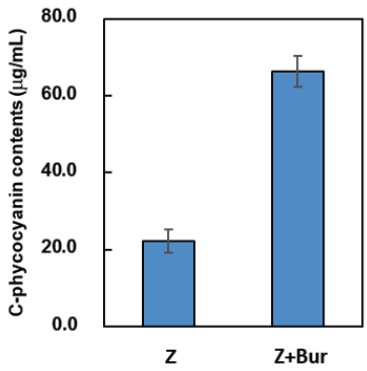
การวิเคราะห์และหาปริมาณไกลโคเจน

นำเซลล์แห้งของสไปรูลิน่า พลาเทนซิส 0.5 กรัม มาย่อยด้วย 30%(w/v) KOH จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที เก็บส่วนใสโดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาเติม 90% (v/v) เอทานอลปริมาตร 900 ไมโครลิตร นำไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ส่วนที่เป็นไกลโคเจนจะตกตะกอน (pellet) อยู่ด้านล่าง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วที่ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนตะกอนที่ได้มาล้างตะกอนด้วย 90%(v/v) เอทานอล 2 ครั้ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนด้วย 2.5 มิลลิโมลาร์ โซเดียมแอซิเตต (2 mM sodium acetate) ซึ่งวิธีการสกัดดัดแปลงจากวิธีของ Depraetere *et al*. (2015) และ Schlebusch and Forchhammer (2010) คำนวณปริมาณไกลโคเจนจากกลูโคสที่เกิดขึ้นจากไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ด้วย *o*–toluidine reagent (Sigma–Aldrich, USA) รายงานผลในหน่วย % dry cell weight (%w/w(dcw))

ผลการทดลองและอภิปรายผล

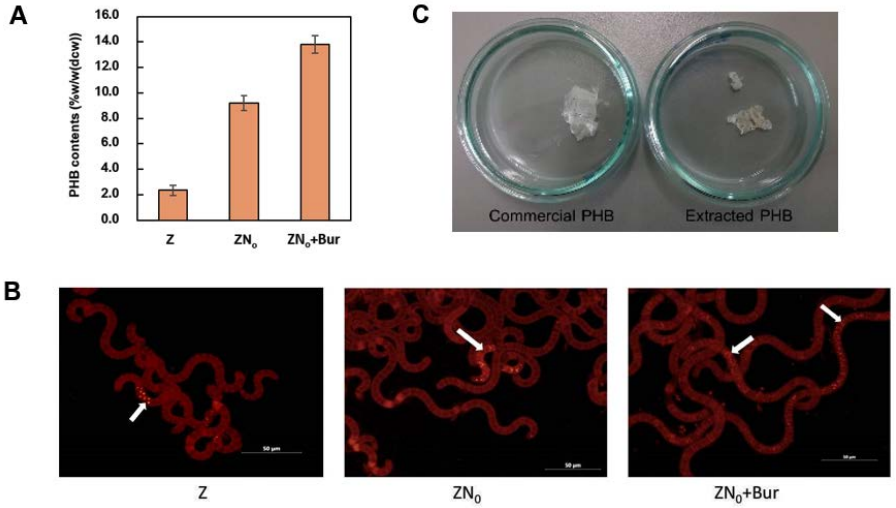
การสะสมซี–ไฟโคไซยานิน พีเอชบีและไกลโคเจนในเซลล์ของสไปรูลิน่า พลาเทนซิส

เมื่อนำเซลล์สไปรูลิน่า พลาเทนซิส ที่เลี้ยงในอาหารเหลวปกติ Zarrouk ที่มีไนเตรตและเสริมบิวทิเรต (Z+Bur) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาปริมาณซี–ไฟโคไซยานิน พบว่า เซลล์สะสมซี–ไฟโคไซยานินเท่ากับ 66.3±5.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงปกติ Zarrouk ที่มีไนเตรต (ภาพที่ 1) แสดงว่าเซลล์สามารถนำบิวทิเรตไปใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนได้ ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มการสะสมซี–ไฟโคไซยานินของ *Nostoc linckia* (Mansouri and Talebizadeh, 2017) อย่างไรก็ตาม สไปรูลิน่า พลาเทนซิส ที่เลี้ยง



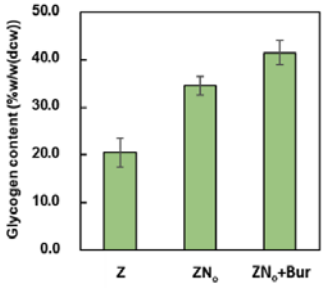
ภาพที่ 1 ปริมาณซี–ไฟโคไซยานิน ของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวปกติ Zarrouk ที่มีไนเตรต (Z) และอาหารเหลวปกติ Zarrouk ที่เสริมบิวทิเรต (Z+Bur) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ในอาหารเหลวปกติ Zarrouk ที่ขาดไนเตรตและเสริมบิวทิเรต ปริมาณซี–ไฟโคไซยานินลดลง เนื่องจากเกิดการย่อยสลายสารประกอบโปรตีนไนโตรเจนภายในเซลล์ (Deschoenmaeker *et al.*, 2016) ต่อมาวิคราะห์พีเอชบีที่สะสมภายในเซลล์สไปรูลิน่า พลาเทนซิส ด้วยการย้อมสี nile red และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรส-เซนซ์ พบว่า เซลล์สไปรูลิน่า พลาเทนซิส ที่เลี้ยงในอาหารเหลวปกติ Zarrouk ที่มีไนเตรต (Z) มีการสังเคราะห์พีเอชบีเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปกติ Zarrouk ที่ขาดไนเตรต (ZN_0) และอาหารเหลวปกติ Zarrouk ที่ขาดไนเตรตเสริมบิวทิเรต (ZN_0+Bur) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบมีการสะสมพีเอชบีภายในเซลล์ซึ่งปรากฏเป็นแกรนูลสีส้มเหลืองมากขึ้น มีปริมาณเท่ากับ 9.2±0.5 %w/w(dcw) และ 13.8±0.3 %w/w(dcw) ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 5 เท่า และ 7 เท่า ในอาหารเหลว ZN_0 และ ZN_0+Bur ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงปกติ (Z) (ภาพที่ 2A–2B) ผลการ



ภาพที่ 2 (A) ปริมาณพีเอชบีภายในเซลล์ของสไปรูลิน่า พลาเทนซิส ที่เลี้ยงในอาหารเหลวปกติ Zarrouk (Z), อาหารเหลวปกติ Zarrouk ที่ขาดไนเตรต (ZN_0) และอาหารเหลวปกติ Zarrouk ที่ขาดไนเตรตเสริมบิวทิเรต (ZN_0+Bur) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (B) การติดสี nile red ของพีเอชบีภายในเซลล์ซึ่งตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ปริมาณพีเอชบีของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวปกติ Z ZN_0 และ ZN_0+Bur เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ (C) ลักษณะทางกายภาพของพีเอชบีทางการค้า (commercial PHB) และพีเอชบีที่สกัดได้จากสไปรูลิน่า พลาเทนซิส (extracted PHB)

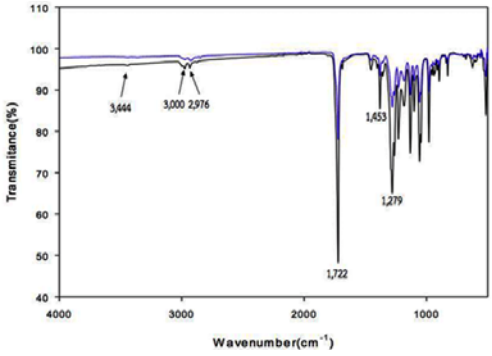
ศึกษาบ่งชี้ว่าสภาวะที่ขาดไนเตรตและเสริมบิวทิเรต เพิ่มการสะสมพีเอชบีได้มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับที่พบใน *Cupriavidus necator* (Kedia *et al*., 2014) แสดงว่าเซลล์สามารถใช้บิวทิเรตในการกระตุ้นการสังเคราะห์พีเอชบีได้ นอกจากนี้มีรายงานว่า *Synechocystis* sp. PCC6803 และ *Arthrospira* sp. PCC8005 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ขาดไนเตรต นอกจากเซลล์สะสมพีเอชบีแล้ว เซลล์ยังเพิ่มการสะสมไกลโคเจนภายในเซลล์ (Depraetere *et al*., 2015, Koch *et al*., 2019, Schlebusch and Forchhammer, 2010) จึงวิเคราะห์และหาปริมาณของไกลโคเจนที่สะสมภายในเซลล์ของสไปรูลิน่า พลาเทนซิส ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ZN_0 และ ZN_0+Bur เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เซลล์สะสมไกลโคเจนเท่ากับ 34.50±2.1 %w/w(dcw) และ 41.50±2.5%w/w(dcw) ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 1.7 เท่า และ 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงปกติ (Z) (ภาพที่ 3) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าการเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงที่เสริมบิวทิเรต กระตุ้นการสะสมไกลโคเจนและพีเอชบีได้ (Bengtsson *et al*., 2010)



ภาพที่ 3 ปริมาณไกลโคเจนของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวปกติ Zarrouk ที่มีไนเตรต (Z) อาหารเหลวปกติ Zarrouk ที่ขาดไนเตรต (ZN_0) และอาหารเหลวปกติ Zarrouk ที่ขาดไนเตรตเสริมบิวทิเรต (ZN_0+Bur) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

โครงสร้างของพีเอชบีที่สกัดจากสไปรูลิน่า พลาเทนซิส

นำพีเอชบีที่สกัดได้จากสไปรูลิน่า พลาเทนซิส ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่ขาดไนเตรตและเสริมบิวทิเรตเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 2C) มาวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลด้วย FTIR ในช่วงสเปกตรัม 4,000 ถึง 500 cm^{-1} (Ansari and Fatma, 2016) พบว่าโครงสร้างโมเลกุลของพีเอชบีที่สกัดได้มีหมู่ฟังก์ชัน Ester carbonyl (O–C=O) ที่พีค 1,722 cm^{-1} หมู่ฟังก์ชัน $–CH_3$ ที่พีค 2,976 cm^{-1} หมู่ฟังก์ชัน $–CH_2$ หรือ –CH ที่พีค 1,453 cm^{-1} และหมู่ฟังก์ชัน O–H ที่พีค 3,444 cm^{-1} ซึ่งมีรูปแบบหมู่ฟังก์ชันเหมือนกับพีเอชบีทางการค้า (ภาพที่ 4) จึงยืนยันได้ว่าสารที่สกัดได้จากสไปรูลิน่า พลาเทนซิสเป็นพีเอชบี อย่างไรก็ตามการตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของพีเอชบีที่สกัดได้ต้องวิเคราะห์เพิ่มเติมต่อไป



ภาพที่ 4 การวิเคราะห์โครงสร้างของพีเอชบีที่สกัดได้จากสไปรูลิน่า พลาเทนซิสที่เลี้ยงในอาหารเหลวปกติ Zarrouk ที่ขาดไนเตรตและเสริมบิวทิเรต (——, สีน้ำเงิน) ด้วยฟลูเรียร์ทรานส์ฟอร์ม อินฟราเรดสเปคโทรไมโครสโคปี (FTIR) เปรียบเทียบกับพีเอชบีทางการค้า (——, สีดำ)

การสังเคราะห์ซี–ไฟโคไซยานินและพีเอชบีในไซยาโนแบคทีเรีย

ปัจจัยที่มีศักยภาพในการกระตุ้นการสังเคราะห์ซี–ไฟโคไซยานินและพีเอชบีในไซยาโนแบคทีเรีย คือ (i) อัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน (C:N) ภายในเซลล์ (ii) แหล่งคาร์บอนจากภายนอกที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง เช่น แอซิเตต ($C_2H_3O_2$) บิวทิเรต ($C_4H_7O_2$) โพรพิออเนต ($C_3H_5O_2$) valerate ($C_5H_9O_2$) กลูโคส และซูโครส (iii) ความเข้มแสง (light intensity) ถึงแม้ว่าการศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยที่มีศักยภาพในการกระตุ้นการสังเคราะห์ซี–ไฟโคไซยานินและพีเอชบีนั้นมีอย่างแพร่หลาย แต่กระบวนการและกลไกการกระตุ้นการสังเคราะห์ยังไม่ชัดเจน งานวิจัยของ Zhang *et al*. (1999) พบว่าการเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่า พลาเทนซิสในอาหารเหลวปกติ Zarrouk (pH 9.0) ที่เติมกลูโคสและเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้ความเข้มแสงที่เหมาะสมจะกระตุ้นการสะสมซี–ไฟโคไซยานิน (ตาราง 1) ขณะที่ Chen *et al*. (2006) พบว่าการเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่า พลาเทนซิสในอาหารเหลวปกติ Zarrouk (pH 9.0) ที่มีการเติมแอซิเตต ช่วยเพิ่มปริมาณชีวมวลและซี–ไฟโคไซยานินรวมถึง carotenoids และ phycobiliproteins เช่นกัน การศึกษาครั้งนี้พบว่า การเติมบิวทิเรตลงในอาหารเหลวปกติ Zarrouk (pH 9.0) กระตุ้นการสังเคราะห์ซี–ไฟโคไซยานินเพิ่มขึ้น 3 เท่า ภายในเซลล์ของสไปรูลิน่า พลาเทนซิส เมื่อแหล่งคาร์บอนมากเกินพอและไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสมีปริมาณจำกัด ไซยาโนแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์จะเพิ่มการสังเคราะห์พีเอชบีมากขึ้น งานวิจัยของ Martins *et al*. (2014) พบว่า *Spirulina* sp. LEB18 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวปกติ Zarrouk (pH 9.0) ที่มี 0.05 g/L $NaNO_3$ และ 8.4 g/L Na_2CO_3 สามารถเพิ่มการผลิตพีเอชบีได้สูงถึง 44.2% ของเซลล์น้ำหนักแห้ง (ตาราง 2) ขณะที่ Shrivastav *et al*. (2010) พบว่า *Spirulina subsalsa* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ASNIII ที่มี 0.75 g/L $NaNO_3$ 8.4 g/L Na_2CO_3 และ 5% NaCl สามารถผลิตพีเอชบีได้สูงถึง 147.75 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง การศึกษาครั้งนี้พบว่าการเติมบิวทิเรตลงในอาหารเหลวปกติ Zarrouk ที่ขาดไน-ตรตและเสริมบิวทิเรตกระตุ้นการสังเคราะห์พีเอชบีเพิ่มขึ้น 9 เท่า ภายในเซลล์ของสไปรูลิน่า พลาเทนซิส

สรุปผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่า พลาเทนซิส ในอาหารที่เสริมบิวทิเรตสามารถกระตุ้นการสะสมซี–ไฟโคไซยานินและพีเอชบีได้ จากสภาวะดังกล่าวสามารถนำมาใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาและปรับสภาวะของน้ำทิ้งจากการหมักกากน้ำตาลอ้อยหรือน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันมะกอกที่มีบิวทิเรตเป็นองค์ประกอบมาเป็นอาหารเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่า พลาเทนซิส ซึ่งจะเป็นการเพิ่มมูลค่าและลดต้นทุนของอาหารเลี้ยงได้ นอกจากนี้การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ประสบความสำเร็จเพื่อใช้ในการเพิ่มการผลิตซี–ไฟโคไซยานินและพีเอชบีได้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย งานวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยบัณฑิตศึกษาด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร จากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์กรมหาชน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563

ตาราง 1 การสังเคราะห์ซี–ไฟโคไซยานินในไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียที่สังเคราะห์ซี–ไฟโคไซยานิน	แหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยง	เอกสารอ้างอิง
Anabaena azollae	BG_{110}, 5.0 g/L glucose	Vasudevan *et al*. (2007)
Anabaena cylindrica	BG_{110}, 5.0 g/L sucrose	Vasudevan *et al*. (2007)
Spirulina platensis	Zarrouk	Sharma (2014)
Spirulina platensis	Zarrouk, 2.0 g/L glucose	Zhang *et al*. (1999)
Spirulina platensis	Zarrouk, 2.0 g/L acetate	Chen *et al*. (2006)
Spirulina platensis	Zarrouk, 0.05%(w/v) butyrate	This study

ตาราง 2 การสังเคราะห์พีเอชบีในไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียที่สังเคราะห์พีเอชบี	แหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยง	เอกสารอ้างอิง
Anabaena cylindrica	None, 0.02 g/L of Na_2CO_3	Omar *et al*. (2016)
Gleocapsa gelatinosa	1.5 g/L of $NaNO_3$, 0.02 g/L of Na_2CO_3	Ansari and Fatma (2016)
Nostoc punctiforme	None, 0.02 g/L of Na_2CO_3	Ansari and Fatma (2016)
Spirulina subsalsa	0.75 g/L of $NaNO_3$, 0.02 g/L of Na_2CO_3	Shrivastav *et al*. (2010)
Spirulina sp. LEB 18	0.25 g/L of $NaNO_3$, 8.4 g/L of Na_2CO_3	Martins *et al*. (2014)
Spirulina platensis	None, 16.8 g/L of $NaHCO_3$, 0.05%(w/v) butyrate	This study

เอกสารอ้างอิง

Ansari, S., and Fatma, T. (2016). Cyanobacterial polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, optimization and characterization. **PLoS ONE** 11(6): e0158168.

Bengtsson, S., Pisco, A. R., Reis, M. A. M., and Lemos, P. C. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates from fermented sugar cane molasses by a mixed culture enriched in glycogen accumulating organisms. **Journal of Biotechnology** 145(3): 253–263.

Bennett, A., and Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamenttous blue–green alga. **Journal of Cell Biology** 58(2): 419–435.

Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., and Alvarez, V. (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. **Express Polymer Letters** 8(11): 791–808.

Chen, T., Zheng, W., Yang, F., Bai, Y., and Wong, Y.–S. (2006). Mixotrophic culture of high selenium–enriched *Spirulina platensis* on acetate and the enhanced production of photosynthetic pigments. **Enzyme and Microbial Technology** 39(1): 103–107.

Depraetere, O., Pierre, G., Deschoenmaeker, F., Badri, H., Foubert, I., Leys, N., Markou, G., Wattiez, R., Michaud, P., Muylaert, K.

(2015). Harvesting carbohydrate–rich *Arthrospira platensis* by spontaneous settling. **Bioresource Technology** 180: 16–21.

Deschoenmaeker, F., Facchini, R., Cabrera–Pino, J. C., Bayon–Vicente, G., Sachdeva, N., Flammang, P., and Wattiez, R. (2016). Nitrogen depletion in *Arthrospira* sp. PCC 8005, an ultrastructural point of view. **Journal of Structural Biology** 196(3): 385–393.

Duangsri, C., and Raksajit, W. (2016). Polyhydroxyalkanoates: An alternative biomaterial for renewable plastic. **Journal of Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning** 7(2): 414–423.

Eriksen, N. T. (2008). Production of phycocyanin – A pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. **Applied Microbiology and Biotechnology** 80(1): 1–14.

Kedia, G., Passanha, P., Dinsdale, R. M., Guwy, A. J., and 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.

Koch, M., Doello, S., Gutekunst, K., and Forchhammer, K. (2019). PHB is produced from Glycogen turn–over during nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **International Journal of Molecular Sciences** 20(8): 1942.

Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G., and Al–Hazimi, A. (2013). Recent developments in production and biotechnological applications of *c*–phycocyanin. **BioMed Research International** 2013: 742859.

Limoli, D. H., Jones, C. J., and Wozniak, D. J. (2015). Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. **Microbiology Spectrum** 3(3): MB–0011–2014.

Mansouri, H., and Talebizadeh, R. (2017). Effects of indole–3–butyric acid on growth, pigments and UV–screening compounds in *Nostoc linckia*. **Phycological Research** 65(3): 212–216.

Martins, R. G., Severo Gonçalves, I., de Morais, M. G., and Costa, J. A. V. (2014). Bioprocess engineering aspects of biopolymer production by the cyanobacterium *Spirulina* strain LEB 18. **International Journal of Polymer Science** 2014: 895237.

Masood, F., Yasin, T., and Hameed, A. (2014). Comparative oxo–biodegradation study of poly–3-hydroxybutyrate–co–3–hydroxyvalerate/polypropylene blend in controlled environments. **International Biodeterioration and Biodegradation** 87: 1–8.

Monshupanee, T., and Incharoensakdi, A. (2014). Enhanced accumulation of glycogen, lipids and polyhydroxybutyrate under optimal nutrients and light intensities in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Journal of Applied Microbiology 116(4): 830–838.

Omar, H. H., Aly, M. M., Al–Malki, W. J., and Balkhair, K. S. (2016). Production and enhancement of poly–β–hydroxybutyrate in cyanobacteria. **Main Group Chemistry** 15(2): 153–161.

Raksajit, W., Satchasataporn, K., Lehto, K., Mäenpää, P., and Incharoensakdi, A. (2012). Enhancement of hydrogen production by the filamentous non–heterocystous cyanobacterium *Arthrospira* sp. PCC 8005. **International Journal of Hydrogen Energy** 37(24): 18791–18797.

Raza, Z. A., Abid, S., and Banat, I. M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. **International Biodeterioration & Biodegradation** 126: 45–56.

Sanhueza, C., Acevedo, F., Rocha, S., Villegas, P., Seeger, M., and Navia, R. (2019). Polyhydroxyalkanoates as biomaterial for electrospun scaffolds. **International Journal of Biological Macromolecules** 124: 102–110.

Shanmugam, A., Sigamani, S., Venkatachalam, H., Jayaraman, J. D., and Ramamurthy, D. (2017). Antibacterial activity of extracted phycocyanin from *Oscillatoria* sp. **Journal of Applied Pharmaceutical Science** 7(3): 62–67.

Schlebusch, M., and Forchhammer, K. (2010). Requirement of the nitrogen starvation–induced protein s110783 for polyhydroxybutyrate accumulation in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. **Applied and Environmental Microbiology** 76(18): 6101–6107.

Sharma, G., Kumar, M., Ali, M. I., and Jasuja, N. D. (2014). Effect of carbon content, salinity and pH on Spirulina platensis for phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrin accumulation. **Journal of Microbial and Biochemical Technology** 6(4): 202–206.

Shrivastav, A., Mishra, S. K., and Mishra, S. (2010). Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of India. **International Journal of Biological Macromolecules** 46(2): 255–260.

Sitohy, M., Osman, A., Ghany, A. G. A., and Salama, A. (2015). Antibacterial phycocyanin from *Anabaena oryzae* SOS13. **International Journal of Applied Research in Natural Products** 8(4): 27–36.

Vasudevan, V., Prasanna, R., Sood, A., and Kaushik, B. D. (2007). Enhancing pigment accumulation in *Anabaena* strains using sugars. **Acta Botanica Hungarica** 49 (1–2): 187–198.

Zhang, X.–W., Zhang, Y.–M., and Chen, F. (1999). Application of mathematical models to the determination optimal glucose concentration and light intensity for mixotrophic culture of *Spirulina platensis*. **Process Biochemistry** 34(5): 477–481.