

ผลของการเสริมบิวทิเรตต่อการผลิตสารมูลค่าสูงซี-ไฟโคไซยานิน และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตในสไปรูulina พลาแทนซิส

วิทย์ จรูญไชยพิพัฒน์ นาฏอนงค์ หมุดธรรม อุเทน พรหมอริยะ ฉันท์ชนก ดวงศรี
คมสัน สัจจะสถาพร สุขนิธิ์ งามกาละ และวุฒินันท์ รักษาจิตรี

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 พลาแทนซิสเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงและเจริญได้ในสภาวะที่หลากหลาย สามารถสังเคราะห์สารปฐมภูมิและสารทุติยภูมิที่สำคัญและมีมูลค่าทางเศรษฐกิจได้หลายชนิด เช่น ซี-ไฟโคไซยานิน เพื่อใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตหรือพีเอชบี ซึ่งใช้ผลิตพลาสติกชีวภาพและสามารถทดแทนพลาสติกที่ถูกสังเคราะห์จากกระบวนการทางเคมีได้ในอนาคต ในการศึกษาครั้งนี้การเพาะเลี้ยงในอาหารที่เสริมบิวทิเรตนำมาใช้เพื่อกระตุ้นการเพิ่มการสะสมซี-ไฟโคไซยานินและพีเอชบีของสไปรูลิน่า พลาแทนซิส ผลการศึกษาพบว่า สไปรูลิน่า พลาแทนซิสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวปกติ Zarrouk และเสริมบิวทิเรตความเข้มข้น 0.05%(w/v) เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง มีการสะสมซี-ไฟโคไซยานินเพิ่มสูงขึ้น 3 เท่า ขณะที่สไปรูลิน่า พลาแทนซิสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Zarrouk ที่ขาดไนเตรตและเสริมบิวทิเรตความเข้มข้น 0.05%(w/v) เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง สามารถสะสมพีเอชบีสูงเพิ่มขึ้น 7 เท่า การตรวจสอบโครงสร้างของพีเอชบีที่สกัดได้จากสไปรูลิน่า พลาแทนซิสด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ทรานส์ฟอร์ม อินฟราเรดสเปกโทรไมโครสโคปี (เอฟที-ไออาร์) สามารถยืนยันว่าสารที่สกัดได้เป็นพีเอชบี ผลการทดลองสรุปได้ว่า การเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่า พลาแทนซิสในอาหารที่เสริมบิวทิเรตกระตุ้นการสะสมซี-ไฟโคไซยานินและพีเอชบีได้สูง

คำสำคัญ: สภาวะที่เสริมบิวทิเรต ซี-ไฟโคไซยานิน พีเอชบี สไปรูลิน่า พลาแทนซิส เอฟทีไออาร์

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

Winai Charunchaipat, 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 พลาแทนซิส (*Spirulina platensis*) เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงและเจริญได้ในสภาวะสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย

มีรูปร่างลักษณะเป็นเส้นสายที่ขดเป็นเกลียววนซ้าย ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ผิวเซลล์ประกอบด้วยสารจำพวกพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharides) โปรตีน (proteins) และลิพิด (lipids) (Limoli

et al., 2015) สไปรูลิหน้า พลาแทนซิสสามารถสังเคราะห์สารปฐมภูมิ (primary metabolites) รวมไปถึงสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่สำคัญและมีมูลค่าทางเศรษฐกิจได้หลายชนิด เช่น ซี-ไฟโคไซยานิน (C-phycoerythrin) ซึ่งเป็นโปรตีนรงควัตถุอยู่ภายในเซลล์ของสไปรูลิหน้า พลาแทนซิส มีคุณสมบัติสามารถต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลชีพ และยังเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน (Eriksen 2008; Shanmugam *et al.* 2017; Sitohy *et al.*, 2015) และพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตหรือพีเอชบี (polyhydroxybutyrate (PHB)) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่ได้จากการดัดไขมันภายในเซลล์สไปรูลิหน้า พลาแทนซิส 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) พบว่าการเพาะเลี้ยงสไปรูลิหน้า พลาแทนซิส ภายใต้สภาวะแบบให้แสงและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จากธรรมชาติ (photoautotrophic condition) ในบ่อเพาะเลี้ยงกลางแจ้ง สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์ซี-ไฟโคไซยานิน ได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงภายในที่ร่ม การเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะการใช้สารประ-

กอบอินทรีย์คาร์บอนและแสง (mixotrophic condition) พบว่าสไปรูลิหน้า พลาแทนซิสสามารถเจริญได้เร็ว มีชีวมวลและปริมาณซี-ไฟโคไซยานินภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้นกว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้ photoautotrophic condition ขณะที่ภายใต้สภาวะการใช้สารประกอบอินทรีย์ (heterotrophic condition) ซึ่งเลี้ยงสไปรูลิหน้า พลาแทนซิสในที่มีดและมีการเติมน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโทสเพิ่มในอาหารเลี้ยง พบว่า สไปรูลิหน้า พลาแทนซิส เจริญได้ช้าและมีปริมาณซี-ไฟโคไซยานินต่ำกว่าการเลี้ยงทั้งใน photoautotrophic และ mixotrophic condition นอกจากนี้ พบว่าภายใต้ photoautotrophic condition ที่อาหารเลี้ยงขาดแหล่งไนโตรเจน สไปรูลิหน้า พลาแทนซิสจะปรับเมแทบอลิซึมใหม่เพื่อรักษาสมดุลภายในเซลล์ 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 BG₁₁ ที่ขาดไนเตรตและฟอสเฟต ภายใต้ heterotrophic condition ซึ่งเติมกลูโคส เป็นเวลา 12 วัน มีการสะสมพีเอชบีได้ 21% ของชีวมวลแห้ง (Monshupanee and Incharoensakdi, 2014) สำหรับแบคทีเรีย *Cupriavidus necator* สามารถผลิตพีเอชบีได้เพิ่มขึ้นมากกว่า 2 เท่า ภายใต้สภาวะ fed-batch fermentation ที่เติมกรดแอสติคและกรดบิวทริก เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน (Kedia *et al.* 2014) สำหรับการใช้ประโยชน์ใน

อนาคต การเลือกใช้วัสดุเหลือทิ้งมาเป็นแหล่งอาหารสำหรับจุลินทรีย์ นอกจากจะช่วยลดต้นทุนของอาหารเลี้ยงแล้วยังเป็น การช่วยบำบัดสารตกค้างในสิ่งแวดล้อมด้วย เช่น บิวทิเรต (butyrate) เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนที่สำคัญของจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถพบบิวทิเรตเป็น by-product ในน้ำทิ้งจากการหมักกากน้ำตาลอ้อยหรือน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันมะกอก ดังนั้นหากสามารถนำน้ำทิ้งจากการหมักกากน้ำตาลอ้อยหรือน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันมะกอกที่มีบิวทิเรตเป็นองค์ประกอบดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงสไปรูลิना พลาแทนซิสได้ จะเป็นการเพิ่มมูลค่าและลดต้นทุนในการเตรียมอาหารเลี้ยงได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อกระตุ้นการสะสมซี-ไฟโคไซยานินและพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตในเซลล์ของสไปรูลิना พลาแทนซิส ภายใต้สภาวะที่เสริมบิวทิเรต

วิธีการดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยงสไปรูลิना พลาแทนซิส

เพาะเลี้ยงสไปรูลิना พลาแทนซิสในอาหารเหลวปกติ 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) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Genesys 20 ยี่ห้อ Thermo scientific สำหรับการกระตุ้นการสะสมซี-ไฟโคไซยานิน นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวปกติ Zarrouk (pH 9.0) เป็นเวลา 7 วัน ($OD_{730} \sim 1.2$) จากนั้นนำเซลล์ไปใส่อาหารเลี้ยงอาหารเหลวปกติ

Zarrouk (pH 9.0) ที่มีการเสริมบิวทิเรตความเข้มข้น 0.05%(w/v) (Z+Bur) จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับการกระตุ้นการสะสมพีเอชบี นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวปกติ Zarrouk (pH 9.0) เป็นเวลา 7 วัน ($OD_{730} \sim 1.2$) ไปใส่ในอาหารเลี้ยง Zarrouk (pH 9.0) ที่ขาดไนเตรต (ZN_0) ที่มีการเสริมบิวทิเรตความเข้มข้น 0.05%(w/v) (ZN_0+Bur) จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์มาวิเคราะห์การสะสมซี-ไฟโคไซยานินและพีเอชบี

การวิเคราะห์และหาปริมาณซี-ไฟโคไซยานิน

นำเซลล์แห้งของสไปรูลิना พลาแทนซิส 0.5 กรัม ละลายในน้ำปริมาณ 40 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ (sonicator) ที่ความถี่ 20 กิโลเฮิร์ตซ์ เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนน้ำของสารสกัดโดยการนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยระวังไม่ทำให้สารสกัดโดนแสงหรือความร้อน จากนั้นวัดการดูดกลืนของสารสกัดที่ความยาวคลื่น 652 และ 615 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Genesys 20 ยี่ห้อ Thermo scientific และคำนวณหาปริมาณของซี-ไฟโคไซยานินด้วยสูตรของ Bennett and Bogorad (1973)

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

การวิเคราะห์และหาปริมาณพีเอชบีที่สะสมอยู่ในเซลล์

ผสมเซลล์สไปรูลิना พลาแทนซิสกับสีย้อม Nile red บนแผ่นแก้วปิดด้วย cover slip และ

บ่มในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที ตรวจการติดสีของพีเอชบีด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (ZEISS LabA1 AXIO) ที่ความยาวคลื่น 559 นาโนเมตร (emission wavelength) พีเอชบีจะพบลักษณะเป็นแกรนูลสีส้มเหลืองสามารถสังเกตเห็นได้ในเซลล์ สำหรับการสกัดพีเอชบี นำเซลล์แห้งของสไปรูลิน่า พลาแทนซิส 0.5 กรัม แช่ในเมทานอลเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น เก็บตะกอน (pellet) ด้วยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วที่ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำตะกอนมาต้มในคลอโรฟอร์มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นำส่วนใสมาระเหยคลอโรฟอร์มออกจนเกิดตะกอนพีเอชบี จากนั้นล้างตะกอนพีเอชบีด้วยเอซิโตนที่เย็น ระเหยเอซิโตนจนพีเอชบีแห้ง 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 อินฟราเรดสเปกโทรไมโครสโคปี (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)

การวิเคราะห์และหาปริมาณไกลโคเจน

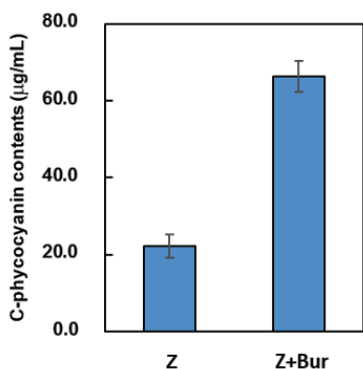
นำเซลล์แห้งของสไปรูลิน่า พลาแทนซิส 0.5 กรัม มาย่อยด้วย 30%(w/v) KOH จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 นาที เก็บส่วนใสโดยการปั่นเหวี่ยง

ด้วยความเร็วที่ 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 โซเดียมแอสเตต (2 mM sodium acetate) ซึ่งวิธีการสกัดดัดแปลงจากวิธีของ Depraetere *et al.* (2015) และ Schlebusch and Forchhammer (2010) กำหนดปริมาณไกลโคเจนจากกลูโคสที่เกิดขึ้นจากไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ด้วย o-toluidine reagent (Sigma-Aldrich, USA) รายงานผลในหน่วย % dry cell weight (%w/w(dcw))

ผลการทดลองและอภิปรายผล

การสะสมซี-ไฟโคไซยานิน พีเอชบีและไกลโคเจนในเซลล์ของสไปรูลิน่า พลาแทนซิส

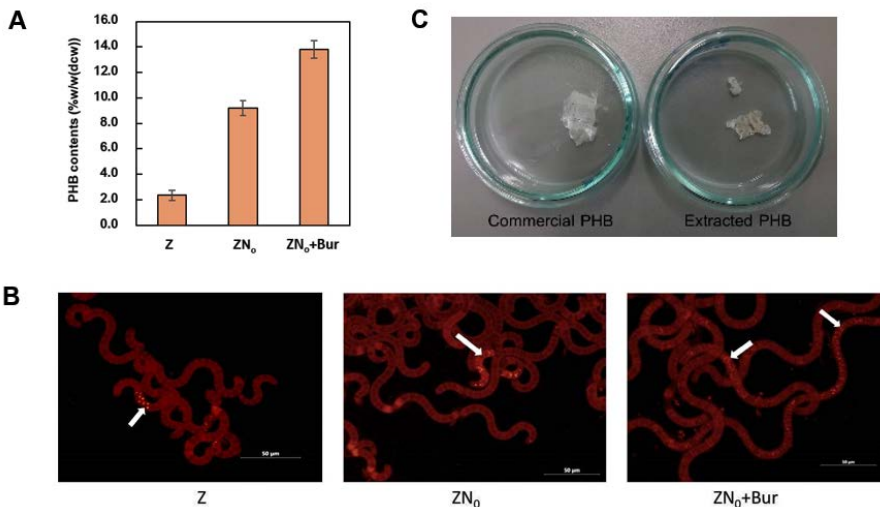
เมื่อนำเซลล์สไปรูลิน่า พลาแทนซิส ที่เลี้ยงในอาหารเหลวปกติ Zarrouk ที่มีไนเตรตและเสริมบิวทิเรต (Z+Bur) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาปริมาณซี-ไฟโคไซยานิน พบว่า เซลล์สะสมซี-ไฟโคไซยานินเท่ากับ 66.3 ± 5.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงปกติ Zarrouk ที่มีไนเตรต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



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

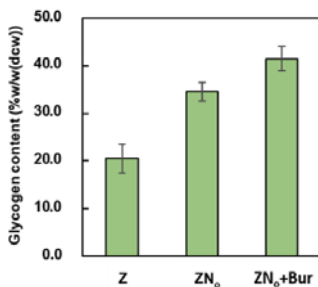
ในอาหารเหลวปกติ Zarrouk ที่ขาดไนเตรตและเสริมบิวทิเรต ปริมาณซี-ไฟโคไซยานินลดลงเนื่องจากเกิดการย่อยสลายสารประกอบโปรตีน

ไนโตรเจนภายในเซลล์ (Deschoenmaeker *et al.*, 2016) ต่อมาวิเคราะห์พีเอชบีที่สะสมภายในเซลล์สไปรูลีนา พลาแทนซิส ด้วยการย้อมสี Nile red และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ พบว่า เซลล์สไปรูลีนา พลาแทนซิส ที่เลี้ยงในอาหารเหลวปกติ Zarrouk ที่มีไนเตรต (Z) มีการสังเคราะห์พีเอชบีเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปกติ Zarrouk ที่ขาดไนเตรต (Z_{N0}) และอาหารเหลวปกติ Zarrouk ที่ขาดไนเตรตเสริมบิวทิเรต (Z_{N0}+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 Z_{N0} และ Z_{N0}+Bur ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงปกติ (Z) (ภาพที่ 2A-2B) ผลการ



ภาพที่ 2 (A) ปริมาณพีเอชบีภายในเซลล์ของสไปรูลีนา พลาแทนซิส ที่เลี้ยงในอาหารเหลวปกติ Zarrouk (Z), อาหารเหลวปกติ Zarrouk ที่ขาดไนเตรต (Z_{N0}) และอาหารเหลวปกติ Zarrouk ที่ขาดไนเตรตเสริมบิวทิเรต (Z_{N0}+Bur) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (B) การติดสี Nile red ของพีเอชบีภายในเซลล์ซึ่งตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ปริมาณพีเอชบีของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวปกติ Z Z_{N0} และ Z_{N0}+Bur เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ (C) ลักษณะทางกายภาพของพีเอชบีทางการค้า (commercial PHB) และพีเอชบีที่สกัดได้จากสไปรูลีนา พลาแทนซิส (extracted PHB)

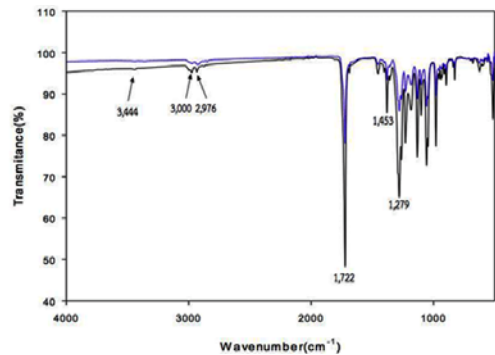
ศึกษาพบว่าสภาวะที่ขาดไนเตรตและเสริมบิว-
ทิเรต เพิ่มการสะสมฟิเอซบีได้มากที่สุด ซึ่งสอด-
คล้องกับที่พบใน *Cupriavidus necator* (Kedia
et al., 2014) แสดงว่าเซลล์สามารถใช้บิวทิเรตใน
การกระตุ้นการสังเคราะห์ฟิเอซบีได้ นอกจากนี้มี
รายงานว่า *Synechocystis* sp. PCC6803 และ
Arthrospira sp. PCC8005 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยง
ที่ขาดไนเตรต นอกจากเซลล์สะสมฟิเอซบีแล้ว
เซลล์ยังเพิ่มการสะสมไกลโคเจนภายในเซลล์ (De-
praetere *et al.*, 2015, Koch *et al.*, 2019, Schle-
busch and Forchhammer, 2010) จึงวิเคราะห์และ
หาปริมาณของไกลโคเจนที่สะสมภายในเซลล์ของ
สไปรูลีนา พลาแทนซิส ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ZN_0
และ ZN_0+Bur เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เซลล์
สะสมไกลโคเจนเท่ากับ $34.50 \pm 2.1\%$ w/w(dcw)
และ $41.50 \pm 2.5\%$ w/w(dcw) ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ
1.7 เท่า และ 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร
เลี้ยงปกติ (Z) (ภาพที่ 3) นอกจากนี้ ยังมีรายงาน
ว่าการเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงที่เสริมบิว-
ทิเรต กระตุ้นการสะสมไกลโคเจนและฟิเอซบีได้
(Bengtsson *et al.*, 2010)



ภาพที่ 3 ปริมาณไกลโคเจนของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร
เหลวปกติ Zarrouk ที่มีไนเตรต (Z) อาหารเหลว
ปกติ Zarrouk ที่ขาดไนเตรต (ZN_0) และอาหาร
เหลวปกติ Zarrouk ที่ขาดไนเตรตเสริมบิวทิเรต
(ZN_0+Bur) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

โครงสร้างของฟิเอซบีที่สกัดจากสไปรู- ลิน่า พลาแทนซิส

นำฟิเอซบีที่สกัดได้จากสไปรูลิน่า พลา-
แทนซิส ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่ขาดไนเตรตและ
เสริมบิวทิเรตเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 2C)
มาวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลด้วย FTIR ในช่วง
สเปกตรัม $4,000$ ถึง 500 cm^{-1} (Ansari and Fatma,
2016) พบว่าโครงสร้างโมเลกุลของฟิเอซบีที่สกัดได้
มีหมู่ฟังก์ชัน Ester carbonyl ($O=C=O$) ที่พีด $1,722\text{ cm}^{-1}$
หมู่ฟังก์ชัน $-CH_3$ ที่พีด $2,976\text{ cm}^{-1}$ หมู่ฟังก์-
ชัน $-CH_2$ หรือ $-CH$ ที่พีด $1,453\text{ cm}^{-1}$ และหมู่
ฟังก์ชัน $O-H$ ที่พีด $3,444\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งมีรูปแบบหมู่
ฟังก์ชันเหมือนกับฟิเอซบีทางการค้า (ภาพที่ 4)
จึงยืนยันได้ว่าสารที่สกัดได้จากสไปรูลิน่า พลา-
แทนซิสเป็นฟิเอซบี อย่างไรก็ตามการตรวจสอบ
คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของฟิเอซบีที่สกัด
ได้ต้องวิเคราะห์เพิ่มเติมต่อไป



ภาพที่ 4 การวิเคราะห์โครงสร้างของฟิเอซบีที่สกัด
ได้จากสไปรูลิน่า พลาแทนซิสที่เลี้ยงในอา-
หารเหลวปกติ Zarrouk ที่ขาดไนเตรตและ
เสริมบิวทิเรต (—, สีน้ำเงิน) ด้วยฟลูเรียร์
ทรานส์ฟอร์ม อินฟราเรดสเปคโทรไมโคร
สโคปี (FTIR) เปรียบเทียบกับฟิเอซบีทางการ
ค้า (—, สีดำ)

การสังเคราะห์ซี-ไฟโคไซยานินและพี-เอชบีในไซยาโนแบคทีเรีย

ปัจจัยที่มีศักยภาพในการกระตุ้นการสังเคราะห์ซี-ไฟโคไซยานินและพีเอชบีในไซยาโนแบคทีเรีย คือ (i) อัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน (C:N) ภายในเซลล์ (ii) แหล่งคาร์บอนจากภายนอกที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง เช่น แอซิเตต ($C_2H_3O_2$) บิวทิเรต ($C_4H_7O_2$) โพรพิอเนต ($C_3H_5O_2$) valerate ($C_5H_9O_2$) กลูโคส และซูโครส (iii) ความเข้มแสง (light intensity) ถึงแม้ว่าการศึกษเกี่ยวกับปัจจัยที่มีศักยภาพในการกระตุ้นการสังเคราะห์ซี-ไฟโคไซยานินและพีเอชบีนั้นมีอย่างแพร่หลาย แต่กระบวนการและกลไกการกระตุ้นการสังเคราะห์ยังไม่ชัดเจน งานวิจัยของ Zhang *et al.* (1999) พบว่าการเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่า พลาเทนิซิสในอาหารเหลวปกติ Zarrouk (pH 9.0) ที่เติมกลูโคสและเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้ความเข้มแสงที่เหมาะสมจะกระตุ้นการสะสมซี-ไฟโคไซยานิน (ตาราง 1) ขณะที่ Chen *et al.* (2006) พบว่าการเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่า พลาเทนิซิสในอาหารเหลวปกติ Zarrouk (pH 9.0) ที่มีการเติมแอซิเตต ช่วยเพิ่มปริมาณชีวมวลและซี-ไฟโคไซยานินรวมถึง carotenoids และ phycobiliproteins เช่นกัน การศึกษาครั้งนี้พบว่า การเติมบิวทิเรตลงในอาหารเหลวปกติ Zarrouk (pH 9.0) กระตุ้นการสังเคราะห์ซี-ไฟโคไซยานินเพิ่มขึ้น 3 เท่าภายในเซลล์ของสไปรูลิน่า พลาเทนิซิส เมื่อแหล่งคาร์บอนมากเกินไปและไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสมีปริมาณจำกัด 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 ที่ขาดไนโตรเจนและเสริมบิวทิเรตกระตุ้นการสังเคราะห์พีเอชบีเพิ่มขึ้น 9 เท่า ภายในเซลล์ของสไปรูลิน่า พลาเทนิซิส

สรุปผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่า พลาเทนิซิส ในอาหารที่เสริมบิวทิเรตสามารถกระตุ้นการสะสมซี-ไฟโคไซยานินและพีเอชบีได้ จากสภาวะดังกล่าวสามารถนำมาใช้เป็นตัวแบบในการพัฒนาและปรับสภาวะของน้ำทิ้งจากการหมักกากน้ำตาลอ้อยหรือน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันมะกอกที่มีบิวทิเรตเป็นองค์ประกอบมาเป็นอาหารเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่า พลาเทนิซิส ซึ่งจะเป็นการเพิ่มมูลค่าและลดต้นทุนของอาหารเลี้ยงได้ นอกจากนี้การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ประสบความสำเร็จเพื่อใช้ในการเพิ่มการผลิตซี-ไฟโคไซยานินและพีเอชบีได้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

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

ตาราง 1 การสังเคราะห์ซี-ไฟโคไซยานินในไซยาโนแบคทีเรีย

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

ตาราง 2 การสังเคราะห์พีเอชบีในไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียที่สังเคราะห์พีเอชบี	แหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยง	เอกสารอ้างอิง
<i>Anabaena cylindrica</i>	None, 0.02 g/L of Na ₂ CO ₃	Omar <i>et al.</i> (2016)
<i>Gleocapsa gelatinosa</i>	1.5 g/L of NaNO ₃ , 0.02 g/L of Na ₂ CO ₃	Ansari and Fatma (2016)
<i>Nostoc punctiforme</i>	None, 0.02 g/L of Na ₂ CO ₃	Ansari and Fatma (2016)
<i>Spirulina subsalsa</i>	0.75 g/L of NaNO ₃ , 0.02 g/L of Na ₂ CO ₃	Shrivastav <i>et al.</i> (2010)
<i>Spirulina sp.</i> LEB 18	0.25 g/L of NaNO ₃ , 8.4 g/L of Na ₂ CO ₃	Martins <i>et al.</i> (2014)
<i>Spirulina platensis</i>	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 filamentous 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.
- Duangstri, 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*-phycoerythrin. **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 Moraes, 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.