

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5380016

ชื่อโครงการ : การปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากน้ำทิ้งชุมชน

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน : ดร.กนกพร สังขรักษ์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

รศ.ดร.พูนสุข ประเสริฐสุรทรัพย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

E-mail Address : skanokphorn@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี (15 มิถุนายน 2553 – 15 มิถุนายน 2555)

จุลินทรีย์ผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (พีเอชเอ) ถูกคัดแยกภายใต้สภาวะในการคัดที่แตกต่างกัน เช่น พีเอช ความเข้มข้นของเกลือ และชนิดของโลหะหนัก จากการทดลองสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์โดยใช้การจำแนกทางพันธุวิศวกรรมได้ 50 ชนิด จัดอยู่ในกลุ่ม *Bacillus* *Proteus* *Pseudomonas* *Aeromonas* *Alcaligenes* และ *Chromobacterium* จากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้พบเพียง 20 ชนิดเท่านั้นที่มีความสามารถในการผลิตพีเอชเอ โดยแบคทีเรีย *Bacillus* จะมีความสามารถในการผลิตพีเอชเอสูง โดยเฉพาะใน *B. licheniformis* สายพันธุ์ PHAs 007 สามารถผลิตพีเอชเอได้ในปริมาณสูงที่สุดถึง 68.80% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากนี้ *Bacillus* สายพันธุ์ PHAs 007 ยังมีความสามารถในการผลิตไลเปสและโปรตีเอส โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 2.1 และ 5.1 ตามลำดับ นอกจากนี้ความสามารถในการใช้สารตั้งต้นของจุลินทรีย์ได้มีการทดสอบโดยการตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ พบว่าจุลินทรีย์ *Bacillus* มีความสามารถในการย่อยสลายสารตั้งต้นที่หลากหลายที่สุด

เพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตพีเอชเอจุลินทรีย์ *Bacillus licheniformis* ถูกนำมาทำกลายพันธุ์ด้วยยูวี และสารเคมี N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) จุลินทรีย์พันธุ์กลาย 380 สายพันธุ์พบว่า *B. licheniformis* สายพันธุ์ M2-12 มีความสามารถสูงสุดในการผลิตมวล (12.01 ± 1.65 กรัมต่อลิตร) และพีเอชเอ (10.49 ± 1.48 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 87.34% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ภายใต้อาหารที่ส่งเสริมการผลิตพีเอชเอ นอกจากนี้แบคทีเรียพันธุ์กลายยังมีความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นของสารตั้งต้น พีเอชเอ และอุณหภูมิที่สูงขึ้น ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจุลินทรีย์พันธุ์กลาย M2-12 มีผลผลิตพีเอชเอเพิ่มขึ้น 3.18 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม หลังจากทดลองถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ลงอาหารใหม่เป็นจำนวน 12 ครั้ง พบว่าจุลินทรีย์พันธุ์กลายมีความเสถียร และมีความสามารถในการผลิตคงเดิม

เพื่อศึกษาผลผลิตของพีเอชเอในสารตั้งต้นที่มีราคาถูก โดยใช้ของเสียจากชุมชนทั้งส่วนที่เป็นตะกอนและน้ำทิ้ง โดยทำการศึกษาในจุลินทรีย์สองสายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus licheniformis* (TSU-007 สายพันธุ์ดั้งเดิม และ M2-12 สายพันธุ์กลาย) เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการผลิตพบว่าค่าพีเอช BOD_5 และ COD มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าเท่ากับ 7.05 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ นอกจากนี้ในน้ำทิ้งหลังการบำบัดยังพบกรดอะซิติก โพรพิโอนิก บิวทิริก และวาเลอริก ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตพีเอชเออีกด้วย จากการทดลองพบว่าจุลินทรีย์พันธุ์กลายสายพันธุ์ M2-12 จะให้ผลผลิตสูงสุดเมื่อใช้ของเสียจากชุมชนเป็นสารตั้งต้น โดยสามารถผลิตมวลได้เท่ากับ 42.01 ± 2.04 กรัมต่อลิตร และผลิตพีเอชเอได้ 37.35 ± 1.04 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 88.9% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และยังสามารถลดค่า COD ในของเสียชุมชนได้ถึง 68.94% เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 60 ชั่วโมง พีเอชเอที่ได้จาก *B. licheniformis* สายพันธุ์ TSU-007 และ M2-12 ที่เก็บเกี่ยวจากถังหมักสำหรับการผลิตพีเอชเอ พบว่าเป็นพอลิเมอร์ชนิด poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate [P(3HB-co-3HV)] ที่มีองค์ประกอบของ HB และ HV เป็น 60% และ 40% ตามลำดับ จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าการผลิตพีเอชเอจากของเสียชุมชนมีความเป็นไปได้สูงในการผลิต และยังสามารถแทรกการผลิตพีเอชเอลงไปในกระบวนการบำบัดของเสียชุมชนที่มีอยู่เดิม นอกจากจะช่วยเพิ่มมูลค่าของเสีย และลดราคาการผลิตพีเอชเอเพื่อให้แข่งขันกับตลาดได้ การผลิตพีเอชเอยังช่วยบำบัดของเสียจากชุมชนในเวลาเดียวกันด้วย

คำหลัก : การกลายพันธุ์ต่อเนื่อง การบำบัดแบบสองขั้น พีเอชเอ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ของเสียชุมชน

Abstract

Project Code : MRG5380016

Project Title : Improvement of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria and production of polyhydroxyalkanoate using municipal wastewater as carbon source

Investigators : Dr.Kanokphorn Sangkharak Thaksin University
Assoc. Prof. Dr.Poonsuk Prasertsan Prince of Songkla University

E-mail Address : skanokphorn@yahoo.com

Project Periods : 2 years (15 June 2010 – 15 June 2012)

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) accumulating bacteria were isolated under various selective conditions such as pH, salt concentrations and types of heavy metal. Fifty strains of bacterial isolates were found to belong to *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes* and *Chromobacterium* based on phenotypical features and genotypic investigation. Only twenty five bacterial isolates were selected and observed for the production of PHAs. Interestingly, bacteria belonging to Firmucutes *Bacillus* sp. produced high amount of PHAs. The maximum PHAs was accumulated by *B. licheniformis* PHAs 007 at 68.80% of dry cell weight (DCW). In additional, *Bacillus* strain PHAs 007 had a highest lipase and protease activity at 2.1 and 5.1, respectively. Determination of metabolic characteristics was also investigated to check for their ability to consume wide range of substrates. *Bacillus* strains had great ability to utilize variety of substrates.

The enhanced production of PHAs was attempted using mutant *Bacillus licheniformis*. *B. licheniformis* M2-12, a prominent strain, was selected from 380 mutants after sequential treatment by UV and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) based on their

(iii)

high biomass and PHAs concentration.. The mutant strain M2-12 gave the highest value of biomass (12.01 ± 1.65 g/L) and PHAs concentration (10.49 ± 1.48 g/L with 87.34% of DCW) in PHAs producing medium. Interestingly, mutant strain showed higher resistance to substrate concentration, pH and temperature than the wild. Under optimum condition, the accumulation of PHAs was increased by 3.18-fold. After being subcultured 12 times, the production of the mutant M2-12 was stable.

The local municipal wastes including wastewater and sludge were utilized as substrates for the production of PHAs using two strains of *Bacillus licheniformis* (TSU-007, wild type and M2-12, mutant). The value of pH, BOD₅ and COD of the supernatant after treatment was 7.05, 20 and 40 mg/L, respectively. Additionally, acetic acid, propionic acid, butyric acid and valeric acid were also presented as major organic acids. Interestingly, the mutant strain M2-12 gave the highest value of biomass (42.01 ± 2.04 g/L) and PHAs concentration (37.35 ± 1.04 g/L with 88.9% of dry cell weight, DCW) and reduced 68.94% of soluble COD after 60 h of cultivation. The resultant polymer from *B. licheniformis* TSU-007 and M2-12 cultivated in the PHAs production reactor was identified to be poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate [P(3HB-co-3HV)] consisted of 60%HB and 40%HV fraction. The results suggesting that the production of PHAs by municipal wastes is feasible thus the PHAs production stage can be integrated in waste treatment to produce PHAs and treated municipal wastes at the same time.

Keywords : PHAs, Polyhydroxyalkanoates, Municipal waste, Sequential mutagenesis, two-stage batch reactor