Effect of Microgravity on poly-gamma-Glutamic Acid Production from *Bacillus subtilis*

การสัมมนา NAC 2019
ความก้าวหน้างานวิจัยคนไทยเพื่อการทดลองบนอวกาศ"

28 มีนาคม 2562 ห้องประชุม CC-305 ชั้น 3

อาคารศูนย์ประชุมอุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย (CC)

อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย

Effect of Microgravity on poly-gamma-Glutamic Acid Production from *Bacillus subtilis*

Principal Investigator : Suwimol Jetawattana

Co-investigator (s) : Piyawan Gasaluck
Thitikorn Mahidsanan
Worapan Sitthithaworn
Danupon Nantajit

Poly-gamma glutamic acid (PGA)

- พบเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่สร้างโดย แบคทีเรีย เช่น B. subtilis และ B. licheniformis มีลักษณะเหนียวหนืด สามารถละลายน้ำ และรับประทานได้โดยไม่เป็นพิษ
- พบในอาหารหมักพื้นเมือง เช่น natto หรือ ถั่วเน่า

Significance

- กรดพอลิแกมมากลูตามิก (PGA) มีศักยภาพที่หลากหลายในการนำมาประยุกต์ใช้งานด้านชีวการแพทย์ รวมไปถึงอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง แต่การใช้งานยังมีจำกัดเนื่องมาจากการผลิตได้น้อย
- การสร้างผลผลิต PGA ได้มากขึ้นย่อมเป็นประโยชน์ต่อการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้อง

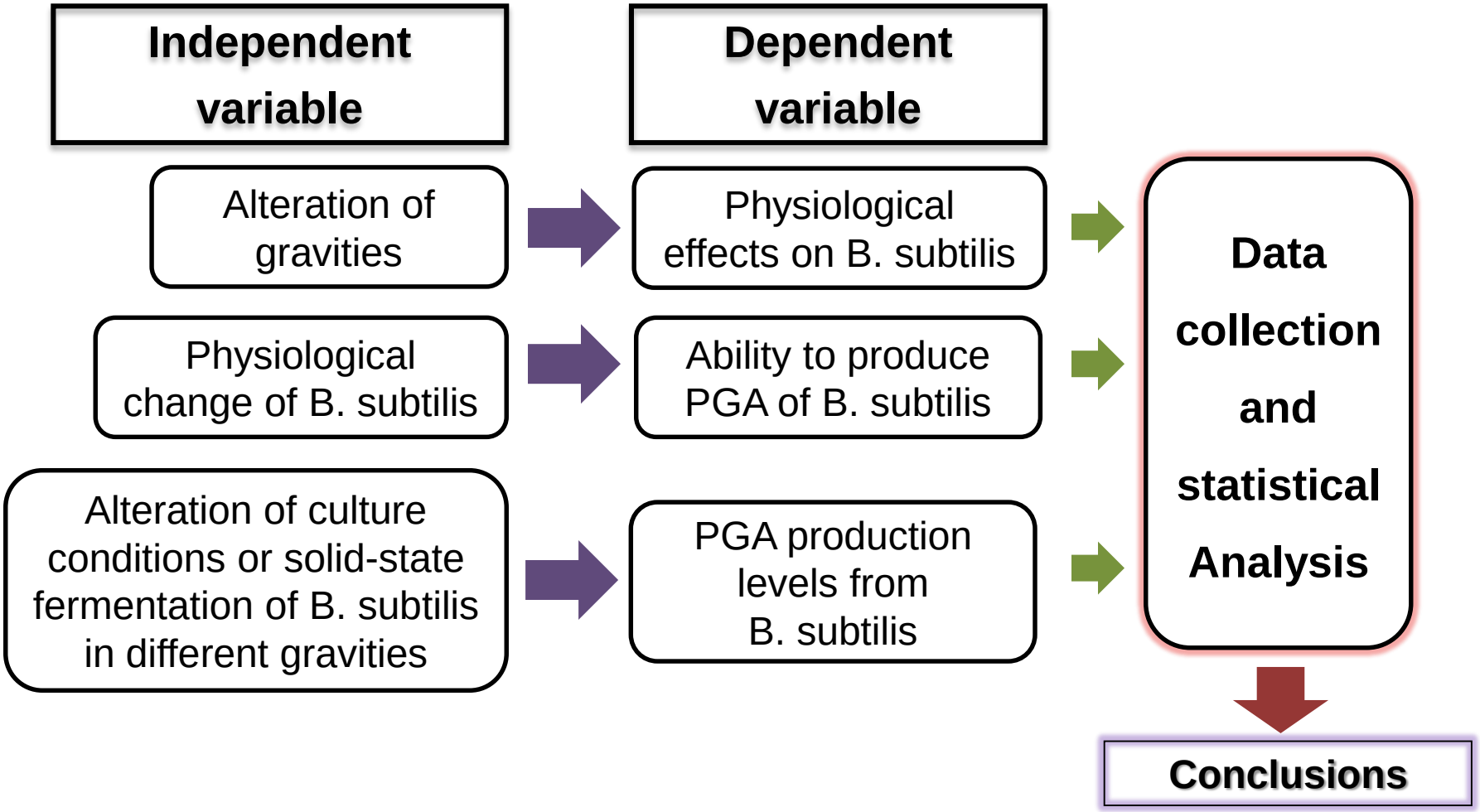
Scientific hypothesis & Relevant theory

- โดยทั่วไป แบคทีเรียสามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันไป ทั้งน้ำหนักโมเลกุล และโครงสร้างที่เป็น enantiomer
- มีรายงานเกี่ยวกับการสร้างผลผลิต poly-gamma-glutamic acid ที่แตกต่างกันในแบคทีเรีย Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis ที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน
- มีรายงานถึงลักษณะรูปร่างและพฤติกรรมการเกาะกลุ่มกันของเซลล์ E. coli ที่เปลี่ยนไป เมื่อทดลองเพาะเลี้ยงในอวกาศ ส่งผลให้มีการสร้าง biofilm มากขึ้น
- ดังนั้น การเลี้ยงเซลล์ B. subtilis ในภาวะแรงโน้มถ่วงต่ำ จึงคาดหวังไว้ว่าจะให้ผลผลิตการสร้างสารทุติยภูมิที่แตกต่างไปจากการเพาะเลี้ยงในสภาวะบนพื้นโลก

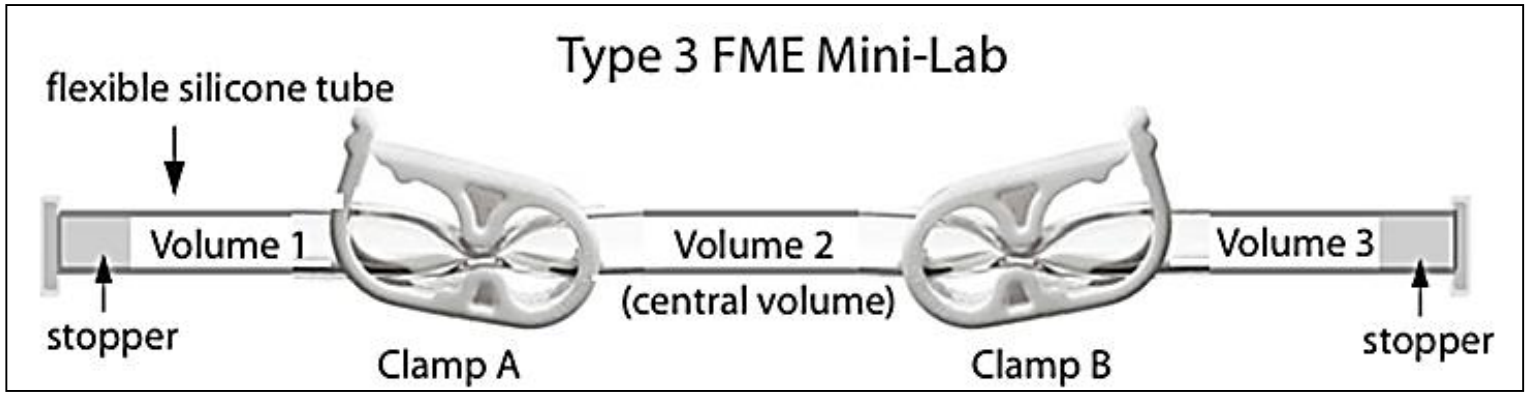
Objectives

- เพื่อตรวจสอบว่าการเพาะเลี้ยงหรือการหมักในสภาวะแรงโน้มถ่วงต่ำจะมีผลต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยแบคทีเรีย Bacillus subtilis

Conceptual Framework



Experiment Design (1)



Volume 1 (bacterial starter)

- Xx ml of B. subtilis starter culture

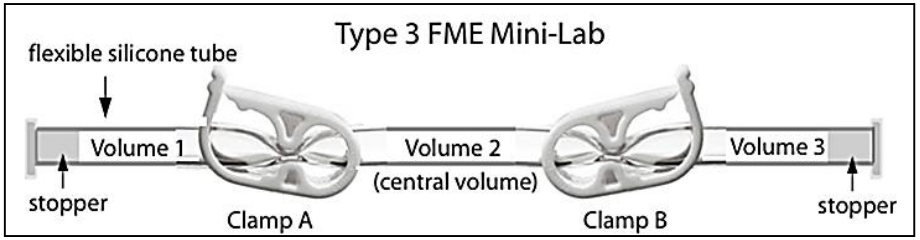
Volume 2 (substrates)

- Xx ml of culture media or soybean substrate

Volume 3 (diluent)

- Xx ml sterile distilled water

Experiment Design (2)



- Type 3 Fluids Mixing Enclosure (FME) tubes will be used
  (3 experiment volumes: two clamps used)
- Two Identical Type 3 FME tubes (for Earth's gravity and microgravity)
- Main tube (volume 2) contains substrate (culture media or soy bean)
- 1 smaller tube (Volume 1) contains B. subtilis
- 1 smaller tube (Volume 3) contains sterile distilled water
- Clamp A (located between Volumes 1 and 2) will be opened first and tilt to mix or shaken
- After optimal incubation times (ie. 24 h) clamp B will be opened allow the sterile distilled water to mix or shaken
- Both tubes will be determined for dissolved PGA quantitatively using spectrophotometric or HPLC method and compared

Broth culture media

Microgravity experiment research temp. (-20 – 48.5 C^{O})

Soybean based substrate

Time	24 h	48 h	72 h
Temp	35 C^{O}	40 C^{O}	45 C^{O}

Earth's gravity

Microgravity

Alteration of gravity

Cell size, cell envelope thickness, viability, growth profiles, spore formation

PGA production levels

pgsB gene characterization, intracellular enzymes (GHD, GOGAT, GS activities) extracellular enzymes (amylase, protease), PGA yields

RSM validation of physiological change between earth and microgravity based on statistical analysis

To achieve the control measurement point

Comments	Responses
การทดลองจำเป็นต้องหา condition ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตกรดหรือไม่ ต้องการทราบข้อมูลเกี่ยวกับงานวิจัยนี้บนภาคพื้นดินเพิ่มเติม	มีข้อมูลภาคพื้นดินครบถ้วนแล้ว มี condition ที่เหมาะสมทั้งการเลี้ยงใน nutrient broth และ การหมักแบบ solid state โดยใช้ถั่วเหลืองเป็น substrate
เนื่องจากการทดลองบนอวกาศเน้นขั้นตอนที่ไม่ซับซ้อน จึงต้องการทราบข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับปัจจัยที่ต้องควบคุมระหว่างการทดลองและระยะเวลาที่ทำการทดลอง	ปัจจัยที่ต้องควบคุมได้แก่ อุณหภูมิและระยะเวลาในการหมัก
ต้องการทราบข้อมูลเพิ่มเติมด้านการประยุกต์ใช้และประโยชน์จากการทดลอง	Food industry : thickener cryoprotectant Medicine : metal chelator drug carrier Others : moisturizer biodegradable plastic
สามารถใช้อุปกรณ์ clinostat ณ ห้องปฏิบัติการอวกาศ ของ GISTDA ดำเนินการศึกษาวิจัยโดยเบื้องต้นได้	สามารถทำการทดลองเบื้องต้นในห้องจำลองสภาวะ microgravity ได้

Previous results

Nutrient broth (NB Submerged fermentation)

- PGA yield at 24 h is 2.57 mg/ml

Substrate Soybean (Solid state fermentation SSF)

- Ammonia 0.8-1.0 % (w/v)
- pH 7.5-8.5
- PGA yield at 36-72 h is 21.69-23.41 mg/g
- Stationary phase is high PGA yield.

เอกสารอ้างอิง

- Gerda Horneck, David M. Klaus, and Rocco L. Mancinelli. (2010). Space Microbiology. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 74(1): 121–156.
- Kedia G, Hill D, Hill R, Radecka I. (2010). Production of poly-gamma-glutamic acid by Bacillus subtilis and Bacillus licheniformis with different growth media. J Nanosci Nanotechnol. 10(9): 5926-34.
- Yu-Jin Oh, Mi-Sun Kwak, and Moon-Hee Sung. (2018). Protection of Radiation-Induced DNA Damage by Functional Cosmeceutical Poly-Gamma-Glutamate. J Microbiol Biotechnol. 28(4): 527–533.
- Luis Zea, et al. (2017). Phenotypic Changes Exhibited by E. coli Cultured in Space. Frontiers in Microbiology. Vol 8 Article 1598.