บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของซับสเตรตที่มีต่อการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV จาก *Bacillus* sp. BA-019 ทั้งชนิดและปริมาณของสารอาหารที่เป็นส่วนประกอบหลักในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือซับสเตรตอื่นที่เติมลงไป รวมทั้งภาวะการเลี้ยงเชื้อบางประการ โดยศึกษาถึงผลของซับสเตรตต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ในองค์ประกอบของโคพอลิเมอร์ PHBV เพื่อให้สามารถเลือกซับสเตรตที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อให้ได้โคพอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ตามที่ต้องการ (เนื่องจากสัดส่วนที่แตกต่างกันส่งผลให้ PHBV มีสมบัติแตกต่างกัน และสามารถเลือกผลิตตามความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้) รวมทั้งศึกษาถึงปริมาณของโคพอลิเมอร์ PHBV และปริมาณชีวมวล (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ให้มีปริมาณมากพอ เพื่อให้เหมาะสมสำหรับการผลิตในระดับขยายส่วนต่อไป

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีของ *Bacillus* sp. BA-019

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีของ *Bacillus* sp. BA-019 พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 เป็นแบคทีเรียที่คล้ายกับสายพันธุ์ *Bacillus megaterium* (Bergey และคณะ, 1986; O'Leary, 1989) การศึกษานี้เป็นการศึกษาทางอนุกรมวิธาน (taxonomy) เบื้องต้นเท่านั้น เนื่องจากมิใช่วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้ ถ้าต้องการทราบสปีชีส์จำเป็นต้องมีการศึกษาอีกหลายด้าน เช่น การหาปริมาณเบสของดีเอ็นเอ (G+C content of the DNA) การหาลักษณะทางแอนติเจน (antigenic characteristics) เป็นต้น (Pelczar และคณะ,1986) อย่างไรก็ตามเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 จัดเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะใกล้เคียงกับ *B. megaterium* และมีข้อได้เปรียบกว่าแบคทีเรียอื่น ที่เชื้อนี้มีขนาดของเซลล์ใหญ่และสามารถใช้ น้ำตาลทรายได้ดี ซึ่งเชื้อนี้เป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกใหม่โดยกลุ่มคณะผู้วิจัยนี้ (รัตนศิริ มุทิตากุล, 2538)

4.2 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ

ผลการศึกษาการเติบโตของ *Bacillus sp.* BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อที่เติมฟรักโตส กลูโคส ซูโครส และน้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร พบว่า มีการเติบโตที่ใกล้เคียงกัน โดยพบว่า การเลี้ยงเชื้อในน้ำตาลทรายมีแนวโน้มการเติบโตสูงกว่าเล็กน้อย จึงเลือกน้ำตาลทรายแทนน้ำตาลฟรักโตสตามสูตรอาหารของ Doi และคณะ (1986) ที่ใช้อยู่เดิมเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ ซึ่งน้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกที่สุด (เมื่อเปรียบเทียบกับเมทานอล กลูโคส เอทานอล บิวทานอล กรดอะซิติก กรดบิวทิริก และน้ำตาลอื่นๆ ตามลำดับ) (Yamane, 1996) นอกจากนั้นยังหาได้ง่ายในประเทศไทยเนื่องจากเป็นผลผลิตทางการเกษตร และงานวิจัยของรัตนศิริ มุทิตากุล (2538) ก็พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 นี้สามารถเติบโตได้ดีในอาหารเพื่อการผลิต (MSM) ที่ใช้น้ำตาลทรายและกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และพิสิษฐ คงกำเนิด (2540) รายงานว่าน้ำตาลปริมาณ 10 กรัมต่อลิตรเป็นปริมาณที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่ให้ปริมาณเซลล์สูง ซึ่งการศึกษานี้เป็นประโยชน์ในการผลิต PHA ในระดับขยายส่วน เพราะปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งของการผลิต คือ ต้นทุนของวัตถุดิบประเภทแหล่งคาร์บอนซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการสามารถใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกจะเป็นการลดต้นทุนการผลิตได้ทางหนึ่ง

4.3 ผลของแหล่งคาร์บอนเดี่ยวชนิดต่างๆ ต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ และปริมาณพอลิเมอร์

Bacillus sp. BA-019 สามารถผลิตเฮเทอร์โรพอลิเมอร์ (พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์มากกว่า 1 ชนิด) จากแหล่งคาร์บอนเดี่ยวบางชนิด ได้แก่ กลุ่มของเกลือของกรดอินทรีย์ กรดไขมัน และกลุ่มของน้ำตาล ส่วนกลุ่มน้ำมันพืชและแอลกอฮอล์ไม่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว เมื่อพิจารณาจากกลุ่มของเกลือของกรดอินทรีย์ กรดไขมัน และกลุ่มของน้ำตาล พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิตพอลิเมอร์ซึ่งเป็นโมโนเมอร์ของ 3HB เป็นส่วนใหญ่ และสามารถผลิตโมโนเมอร์ชนิดอื่นจากแหล่งคาร์บอนเดี่ยวบางชนิดได้ โดยพบว่าได้โคพอลิเมอร์ P(3HB-*co*-3HV) ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV สูงที่สุด เท่ากับ 6.1 และ 5.6 โมลเปอร์เซ็นต์จากการใช้แลกโตส 20 กรัมต่อลิตร และโซเดียมแลกเตต 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตโมโนเมอร์ 4HB ได้เมื่อใช้โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรตเป็นซับสเตรต โดยได้สัดส่วนของ 4HB เท่ากับ 2.1 โมลเปอร์เซ็นต์ แต่ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-*co*-3HV-*co*-4HB) ต่ำ ส่วนปริมาณพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ในเกณฑ์สูงเท่ากับ 30.01 และ 27.07 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อใช้

โซเดียมอะซิเตต 10 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่พบว่าผลิตได้พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 3HB เพียงชนิดเดียว (เรียกว่าโฮโมพอลิเมอร์ PHB)

เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Son และ Lee (1996) พบว่า *Pseudomonas* sp. EL-2 สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-*co*-3HV) ที่มี 3HV เท่ากับ 2.4 6.9 2.3 และ 1.9 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้น้ำตาลฟรักโตส กลูโคส กลีเซอรอลและซอร์บิทอล อย่างใดอย่างหนึ่ง ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Steinbuchel และ Pieper (1992) ผลิต 3HV ได้ 4 ถึง 7 โมลเปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* H16 สายพันธุ์กลาย R3 จากการใช้ฟรักโตส กลูโคเนต ซัคซิเนต อะซิเตต และแลคเตต เป็นซับสเตรต ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้ ส่วน Lee E.Y. และคณะ (1995) รายงานการผลิตโคพอลิเมอร์ที่มีโมโนเมอร์ชนิด 3HB 4HB และ 3HV จากเชื้อ *Agrobacterium sp.* สายพันธุ์ SH-1 และสายพันธุ์ GW-014 ว่าสามารถผลิต 3HV ได้สัดส่วนสูงที่สุดเท่ากับ 11.4 และ 1.3 โมลเปอร์เซ็นต์ในอาหารที่มีไซโลส (น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม) เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว ทั้งนี้เนื่องจากการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ P(3HB-*co*-3HV) (ดังแสดงวิถีการสังเคราะห์ในรูปที่ 7) ซึ่งการสังเคราะห์ 3HV นั้น อาจได้มาจากวัฏจักร TCA โดยอาศัยเอนไซม์เมทิลมาโลนิลโคเอมิวเทส (methylmalonyl-CoA mutase) เปลี่ยนซัคซินิลโคเอ (succinyl-CoA) เป็นเมทิลมาโลนิลโคเอ แล้วใช้เอนไซม์โพรพิโอนิลโคเอคาร์บอกซิเลส (propionyl-CoA carboxylase) เป็นโพรพิโอนิลโคเอ แล้วจึงรวมตัวกับอะเซทิลโคเอเป็นโมโนเมอร์ 3HV เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย หรือวิถีการสังเคราะห์เทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-*co*-3HV-*co*-4HB) (ดังแสดงในรูปที่ 6) จะเห็นได้ว่าความสามารถในการผลิตโคพอลิเมอร์หรือเทอร์พอลิเมอร์จากแหล่งคาร์บอนเดี่ยวได้นั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อและเอ็นไซม์ที่มีในจุลินทรีย์แต่ละชนิด

4.4 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019

Bacillus sp. BA-019 สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มี 3HV ในสัดส่วนที่สูงขึ้นเมื่อใช้กรดโพรพิโอนิก หรือกรดวาเลอริกร่วมกับน้ำตาลทราย โดยสัดส่วนของ 3HV เพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้น แต่ยังได้โคพอลิเมอร์ปริมาณที่ต่ำ โดยปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกรดโพรพิโอนิกสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกรดวาเลอริก เมื่อใช้โซเดียมโพรพิโอเนตแทนกรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิต PHBV ในปริมาณที่สูงขึ้นเท่ากับ 24.42 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้โซเดียมโพรพิโอเนต 5 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานผลการทดลองส่วนใหญ่ใน

แบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่พบว่าสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์โมโนเมอร์ 3HV ส่วนใหญ่ คือ กรดวาเลอริกหรือกรดโพรพิโอนิก (Doi และคณะ, 1987b; Doi, 1990; Ramsay และคณะ, 1990; Kim J. H. และคณะ, 1992; Page และคณะ, 1992; Son และ Lee, 1996; Cho และคณะ, 1997; Hu และคณะ, 1997) สำหรับการศึกษาใน *Bacillus* บางสายพันธุ์จากงานวิจัยของ Chen และคณะ (1991) พบว่า *Bacillus* ทุกสายพันธุ์ที่ศึกษาสามารถผลิต PHBV ได้ในอาหารที่มีวาเลอริกและโพรพิโอนิก 1.5 กรัมต่อลิตรร่วมกับกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ส่วน Park และคณะ (1997) ได้รายงานว่า *Bacillus thuringiensis* R-510 สามารถผลิต PHBV ได้จากการใช้ซับสเตรตเป็นโซเดียมโพรพิโอเนตร่วมกับกลูโคส

ในการใช้น้ำตาลทรายปริมาณต่างๆผสมกับเกลือของกรดอินทรีย์ พบว่า เมื่อใช้โซเดียมโพรพิโอเนตหรือโซเดียมวาเลอเรตปริมาณ 5 กรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนผสม มีผลให้ *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตได้สัดส่วนของ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ได้สูงเท่ากับ 20 โมลเปอร์เซ็นต์และ 32.18 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้โซเดียมโพรพิโอเนต และ 22 โมลเปอร์เซ็นต์และ 35.18 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้โซเดียมวาเลอเรต ตามลำดับ โดยโมโนเมอร์ 3HV เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสูงสุดเท่ากับ 26 โมลเปอร์เซ็นต์ ที่ 60 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับที่มีผู้รายงานผลการวิจัยไว้ ได้แก่ การวิจัยของ Park และคณะ (1997) ก็พบว่าสัดส่วนของ 3HV ที่ผลิตโดย *Bacillus thuringiensis* R-510 เพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งงานวิจัยของ Ramsay และคณะในปี 1990 Kim J. H. และคณะในปี 1992 Cho และคณะในปี 1997 ได้พบว่าสัดส่วนของ 3HV เพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ เช่นกัน

การศึกษาการใช้โซเดียมวาเลอเรตเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว พบว่าได้สัดส่วนของ 3HV เพิ่มสูงขึ้นมากอย่างชัดเจน โดยโมโนเมอร์ของ 3HV และปริมาณ PHBV สูงสุดเมื่อใช้วาเลอเรตปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร โมโนเมอร์ของ 3HV เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงจากเริ่มต้นถึงชั่วโมงที่ 72 ได้ 3HV สูงสุดเท่ากับ 65 โมลเปอร์เซ็นต์ แต่น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV มีแนวโน้มลดลงเมื่อเลี้ยงเชื้อนานขึ้น อาจเนื่องจาก วงจรธรรมชาติของการเมตาบอไลซ์สารพอลิเมอร์ (cyclic nature of PHA metobolism) ที่ Doi (1990) ได้รายงานไว้ว่า เมื่อถ่ายเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* จากอาหารที่ใช้กรดบิวทิริกเป็นแหล่งคาร์บอน (ซึ่งสะสมโฮโมพอลิเมอร์ PHB อยู่) ลงในอาหารซึ่งใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว พบสัดส่วนของ 3HV ค่อยๆ เพิ่มขึ้นถึง 49 โมลเปอร์เซ็นต์ ที่ 96 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ แต่น้ำหนักเซลล์แห้งลดลงจาก 8.3 เป็น 6.5 กรัมต่อลิตร และโคพอลิเมอร์ลดลงจาก 55 เป็น 42 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ 29

ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ แล้วสูงขึ้นเป็น 52 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ชั่วโมงที่ 96 และเมื่อถ่ายเชื้อมาลงในอาหารที่มีเฉพาะกรดบิวทิริกอีกครั้ง พบว่า โมโนเมอร์ 3HV ค่อยๆลดลง แสดงให้เห็นว่า การสังเคราะห์และการย่อยสลายพอลิเมอร์ภายในเซลล์นั้นเกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา

การศึกษาจากผลในงานวิจัยนี้ พบว่า เมื่อใช้โพรพิโอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว พบว่าได้สัดส่วนของ 3HV เพียง 2 โมลเปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ Doi และคณะ (1987a) รายงานว่า เมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว โพรพิโอนิกถูกนำไปใช้ผลิต 3HB มากกว่า 3HV เนื่องจากโพรพิโอนิลโคเอภายในเซลล์ จะถูกสลายเป็นอะเซทิลโคเอซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ 3HB Lee และคณะ (1994) ก็รายงานไว้ว่า เมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกเพียงอย่างเดียวจะพบการสะสมของไพรูเวท (pyruvate) ในปริมาณสูง เช่นเดียวกับในอาหารที่มีปริมาณกลูโคสสูง ซึ่งอาจเนื่องมาจากกระบวนการกลูโคนีโอเจเนซิส (gluconeogenesis) ของอะเซทิลโคเอ จึงทำให้มีการผลิตโมโนเมอร์ของ 3HB ซึ่งใช้อะเซทิลโคเอเป็นสารตั้งต้น ได้สูงกว่าการผลิต 3HV

4.5 ผลของชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อสัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019

การเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับการผลิตที่ใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ พบว่า การใช้ยูเรีย 1.14 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนให้ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงสุดเท่ากับ 37.83 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งให้ผลดีกว่าการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต และสารสกัดจากยีสต์ เป็นซับสเตรต แต่ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้สำหรับการผลิต PHBV ส่วนใหญ่ ที่มีรายงานในงานวิจัย คือ แอมโมเนียมซัลเฟต (อัญชนา ศุรติขจร, 2536; Son และ Lee, 1996; Park และคณะ, 1997; Grothe และคณะ, 1999; Shimizu และคณะ, 1999) ส่วน Danial และคณะ (1992) รายงานถึงผลของชนิดของเกลือแอมโมเนียม ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต และแอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต พบว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจนทำให้ปริมาณพอลิเมอร์ที่ได้ไม่แตกต่างกัน นอกจากนั้นยังมีผู้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ บางชนิด ได้แก่ Kim, G. J. และคณะ (1992) ศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดย *Alcaligenes* sp. SH-69 ได้ปริมาณ PHBV สูงที่สุดถึง 58.7 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้สารสกัดยีสต์ 2 กรัมต่อลิตรและใช้แมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน Bormann และคณะ (1998) ได้เลือกแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เป็นซับสเตรตในการเลี้ยง *Azotobacter beijerinckii* ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถผลิต PHB ได้ไปพร้อมกับการเติบโต (growth-associated production) ได้ พบว่า เชื้อนี้สามารถผลิต PHB ได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยได้ผลใกล้เคียงกัน

จากการใช้ยูเรียกับการใช้เคซีนเปปโตน (casein peptone) เป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วน Grothe และคณะ (1999) ได้เปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ใน *Alcaligenes latus* แม้พบว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตให้ปริมาณเซลล์และพอลิเมอร์สูง แต่การใช้แอมโมเนียมคลอไรด์และแอมโมเนียมไนเตรต ก็ได้ผลดีกว่าการไม่เติมไนโตรเจน ส่วนการใช้ยูเรียให้ผลใกล้เคียงกับที่ไม่เติมไนโตรเจน

จากผลงานวิจัยนี้การศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนโดยใช้น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตรและโซเดียมวาเลอเรต 5 กรัมต่อลิตร โดยใช้ยูเรียเป็นไนโตรเจน แปรผันอัตราส่วนของ C/N เท่ากับ 10 ถึง 500 โมลต่อโมล พบว่า ได้สัดส่วนของ 3HV สูงที่สุด เท่ากับ 24 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่ออัตราส่วน C/N เท่ากับ 500 ซึ่งสูงกว่าเมื่อใช้ C/N ในอัตราส่วนอื่น และได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงสุด เท่ากับ 50.44 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 5.25 กรัมต่อลิตร เมื่อ C/N เท่ากับ 20 โมลต่อโมล และมีการเติบโตลดลงเมื่อ C/N สูงขึ้นตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Rhee และคณะ (1993) โดย *Alcaligenes* sp. SH-69 ผลการวิจัยของ Shimizu และคณะ (1999a) จากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* และการศึกษาจากเชื้อ *Paracoccus denitrificans* ของ Shimizu และคณะ (1999b) ว่าเมื่อ C/N สูงมีผลให้การผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ได้ปริมาณสูง และศึกษาการควบคุมการผลิต PHB ให้ได้ปริมาณสูงเมื่อจำกัดปริมาณไนโตรเจน (Bitar และ Underhill, 1990; Quagliano และ Miyazaki, 1997; Wang และ Lee, 1997; อดิศักดิ์ หิรัญรัตนากร, 2541) ส่วนการเติบโตของเชื้อสูงเมื่อใช้อัตราส่วนของ C/N ต่ำ แต่ผลของสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่เชื้อผลิตได้แตกต่างกัน โดย Rhee และคณะ (1993) และ Shimizu และคณะ (1999b) พบว่า ได้สัดส่วนของ 3HV สูงเมื่ออัตราส่วนของ C/N ต่ำ ส่วนรายงานของ Son และ Lee (1996) พบว่า เมื่อจำกัดแอมโมเนียมไอออนและซัลเฟตในการเลี้ยง *Pseudomonas* sp. EL-2 ได้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV เพิ่มขึ้นจาก 1.9 เป็น 6.6 และ 5.7 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้น เช่น ในระดับถังหมัก ที่สามารถควบคุมปัจจัยหลายประการที่ทำให้เซลล์มีการเติบโตได้ดี ดังนั้น จึงสามารถเพิ่มปริมาณแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อให้สูงกว่า ปริมาณที่ใช้ในระดับขวดเขย่า มีผลทำให้ได้เซลล์ที่มีความหนาแน่นสูงขึ้นต่อปริมาตรอาหารที่เท่ากัน (ได้ปริมาณผลิตภัณฑ์ต่อแบชเป็นกรัมต่อลิตรเพิ่มมากขึ้น) ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบประการหนึ่งที่เป็นข้อมูลซึ่งได้จากการวิจัยนี้ เพื่อการนำไปใช้ในการผลิตในระดับขยายส่วน เนื่องจากยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูก

4.6 ภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ที่มีผลต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV

4.6.1 ผลของ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การศึกษา pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ของ *Bacillus* sp. BA-019 พบว่า ปริมาณ PHBV สูงสุดเพิ่มขึ้นที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.5 และสัดส่วนของ 3HV สูง เมื่อปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.5 ถึง 8.5 จากผลการทดลองนี้จึงเลือก pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.5 จากรายงานของ Chung และคณะ (1997) ที่เลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* เพื่อการผลิต PHBV โดยปรับ pH เริ่มต้น พบว่า เชื้อมีการเจริญได้ในอาหารที่มีกรดโพรพิโอนิกปริมาณสูงถึง 5 กรัมต่อลิตร ถ้าปรับ pH เท่ากับ 7.5 ในขณะที่ pH ต่ำกว่า 7 ไม่พบการเจริญของเชื้อ ซึ่งสาเหตุของการยับยั้งการเติบโตเพราะกรดโพรพิโอนิกนั้น คาดว่า เกี่ยวข้องกับกลไกการไม่จับตัว (uncoupling) ของกรดโพรพิโอนิกที่ไม่แตกตัว (undissociated propionic acid) ซึ่งสามารถละลายเข้าไปโดยตรงในชั้นลิปิดไบเลเยอร์ในชั้นเมมเบรนของเซลล์ (lipid bilayer of the cell membrane) ได้ และในการควบคุม pH ในการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักซึ่งรายงานโดย อดิศักดิ์ หิรัญรัตนากร (2541) พบว่า การควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุด ซึ่งสูงกว่าการทดลองที่ไม่ควบคุม pH หรือควบคุม pH ต่ำกว่า 7.0

จากการศึกษาในงานวิจัยนี้ พบว่า เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นโซเดียมวาเลอเรตกับน้ำตาลทรายมีผลให้ค่า pH ต่ำลง แต่เมื่อใช้โซเดียมวาเลอเรตเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว pH มีค่าสูงขึ้น ซึ่ง Visser และ Postma (1973) (อ้างถึงใน Kim G. J. และคณะ, 1992) อธิบายกลไกการนำกรดโพรพิโอนิกเข้าสู่เซลล์ โดยกลไกของอิออนของโพรพิโอเนตเข้าสู่เซลล์นั้นเป็นแอนตีพอร์ท (antiport) ของอิออนของไฮดรอกซี หรือเข้าโดยการซึมผ่านของกรดโพรพิโอนิกโดยไม่มีการแตกตัว ซึ่งทั้งสองกลไกนี้มีผลทำให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น

4.6.2 ผลของปริมาณอากาศในการเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019

การศึกษาผลของปริมาณการให้อากาศด้วยการแปรผันปริมาตรอาหารโดยคงที่ขนาดของขวดทดลองและรอบของการเขย่า พบว่า ได้สัดส่วนของ 3HV สูงสุดเท่ากับ 6 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารปริมาตร 50 และ 75 มิลลิลิตรโดยให้ผลใกล้เคียงกัน ปริมาณ PHBV สูงสุดเท่ากับ 44.23 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อใช้ปริมาตรอาหาร 75 มิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดเท่ากับ 5.01 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร ซึ่งแสดงว่าปริมาณอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อสัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV

สรุปผลการทดลองนี้จึงเลือกปริมาตรอาหาร 75 มิลลิลิตรบรรจุในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Park และคณะ (1997) ส่วนผลปริมาณอากาศต่อสัดส่วนของ 3HV ไม่มีรายงานไว้ Rhee และคณะ (1993) กล่าวถึงการเลี้ยงภายใต้ภาวะการจำกัดปริมาณอากาศ คาดว่ามีผลให้ตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้าย (terminal electron acceptor) ถูกจัดส่งให้ไม่เพียงพอจึงทำให้อะเซทิลโคเอเข้ามาสู่วิถีการสังเคราะห์ PHA ได้มากขึ้น ส่วน Bormann และคณะ (1998) ก็พบความสำคัญสำหรับการผลิตพอลิเมอร์ PHB โดยการจำกัดออกซิเจนในการเลี้ยง *Azotobacter beijerinckii* Anderson และ Dawes (1990) พบว่า การเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำที่ DOT 50 เปอร์เซ็นต์ทำให้ปริมาณ PHA ลดลง คาดว่าเนื่องจาก การเพิ่มอัตราการออกซิเดชั่นของ $NAD(P)H_2$ แต่ไม่มีผลต่อการสังเคราะห์ 3HV

4.7 ผลของแร่ธาตุที่สำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV

จากผลการศึกษานี้ พบว่า การจำกัดปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตมีผลทำให้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV มีแนวโน้มสูงขึ้น แต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ซึ่งสอดคล้องกับผลของสารอาหารที่ใช้ในการเลี้ยง *Pseudomonas* sp. EL-2 โดย Son และ Lee (1996) พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตให้สูงขึ้นมีผลให้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ลดลง ส่วนการจำกัดปริมาณโพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ไม่มีผลทำให้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงขึ้น ซึ่งงานของ Park และคณะ (1997) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* R-510 ในอาหารที่ไม่เติมแอมโมเนียม โพแตสเซียม ซัลเฟต แมกนีเซียมหรือเหล็ก อย่างใดอย่างหนึ่ง เปรียบเทียบกับการเติมธาตุดังกล่าวครบทุกอย่าง พบว่า มีการผลิตโคพอลิเมอร์ปริมาณ PHBV สูงที่สุดในอาหารชุดควบคุมที่เติมสารอาหารครบทั้งหมด

4.8 ผลของซับพลีเมนต์ (supplement) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณ PHBV

4.8.1 ผลของกรดและเกลือของกรดอินทรีย์

สำหรับการเติมโซเดียมซิเตรตมีผลให้ *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตโคพอลิเมอร์ได้ปริมาณและน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด เท่ากับ 55.35 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ 4.36 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่มีผลให้ผลิต PHBV ที่มีสัดส่วนของ 3HV ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ

การเติมซับสเตรตอื่นและชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมซับสเตรตเลย โดยโซเดียมอะซิเตตและโซเดียมซัคซิเนตให้ปริมาณ PHBV รองลงมา ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอะเซทิลโคเอเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ซิเตรต อะซิเตต และซัคซิเนต และสารทั้ง 3 นี้เป็นสารมัธยันตร์ในวัฏจักร TCA (Page และคณะ, 1997 ดังรูปที่ 7) ดังนั้นจึงทำให้ปริมาณอะเซทิลโคเอมีมากขึ้น เนื่องจากไม่ต้องนำไปใช้เพื่อการสังเคราะห์สารมัธยันตร์ในวัฏจักร TCA จึงมีปริมาณอะเซทิลโคเอที่จะเข้ากระบวนการสร้างโคพอลิเมอร์ได้มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Lee และคณะ (1996) ที่รายงานว่าการเติมซิเตรตทำให้ได้ปริมาณโฮโมพอลิเมอร์ PHB และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการเติมสารมัธยันตร์ตัวอื่นๆ ในวัฏจักร TCA แต่ไม่มีรายงานผลการวิจัยที่เกี่ยวกับผลการเติมซิเตรตต่อสัดส่วนของ 3HV ส่วน Kim M. K. และคณะ (1996) รายงานว่าการเติมซิเตรตมีผลต่อการกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์บีตาคีโตไทโอเลส และอะเซโตอะเซทิลโคเอรีดักเตส

4.8.2 ผลของกรดอะมิโน

การเติมเมทไธโอนีนมีผลให้ *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีสัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 18 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเติมกรดอะมิโนอื่นที่ศึกษาและชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมกรดอะมิโน ทั้งนี้โมโนเมอร์ 3HV ได้มาจากการรวมตัวของโพรพิโอนิลโคเอกับอะเซทิลโคเอ ดังแสดงในวิถีการสังเคราะห์ 3HV ในรูปที่ 6 ดังนั้นอาจตั้งข้อสันนิษฐานได้ว่า อาจเนื่องมาจากการสังเคราะห์โมโนเมอร์ 3HV จากโพรพิโอนิลโคเอโดยผ่านทางกรดอะมิโน (branch chain amino acid) หรือได้โพรพิโอนิลโคเอจากเมตาบอลิสมของเมทไธโอนีน ซึ่งยังไม่ทราบวิถีการสังเคราะห์ที่แน่นอน (Valentin และ Dennis, 1996; Voet และ Voet, 1995) ศิรวิทย์ สิตปรีชา (2541) ให้ข้อสันนิษฐานว่าการเติมลิวซีน ไอโซลิวซีน อาร์จีนีน และเมทไธโอนีน เป็นซับสเตรตอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของโคแฟกเตอร์ที่สำคัญ ซึ่งมีบทบาทควบคุมการผลิต PHB ของ *Alcaligenes* sp. A-04 ได้แก่ โคเอนไซม์เออิสระ และ NAD(P)H ส่วนปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV และน้ำหนักเซลล์แห้งใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมกรดอะมิโน ซึ่งแตกต่างจากผลการทดลองของ Yoon และคณะ (1995) Lee S. Y. และคณะ (1995) Kim T. W. และคณะ (1996) ที่รายงานว่ากรดอะมิโนบางชนิดกระตุ้นการสังเคราะห์ PHB หรือโคพอลิเมอร์ PHBV

สรุปผลงานวิจัย

1. น้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร เป็นซับสเตรตประเภทคาร์บอนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ

2. *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิตเฮเทอร์โรพอลิเมอร์ (พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์มากกว่า 1 ชนิด) จากซับสเตรตในกลุ่มเกลือของกรดอินทรีย์ กรดไขมัน และกลุ่มของน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยวได้ แต่ได้โมโนเมอร์ของ 3HV ในสัดส่วนที่ต่ำ ส่วนกลุ่มน้ำมันพืชและแอลกอฮอล์ไม่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว สำหรับการผลิตเฮเทอร์โรพอลิเมอร์ได้

3. *Bacillus* sp. BA-019 สามารถใช้โซเดียมวาเลอเรตปริมาณ 20 กรัมต่อลิตรเป็นซับสเตรตประเภทคาร์บอน ที่ทำให้ได้สัดส่วนของ 3HV ที่สูงที่สุด เท่ากับ 65 โมลเปอร์เซ็นต์ ที่ 72 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ แต่น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ได้ยังจัดอยู่ในเกณฑ์ต่ำ

4. จากการใช้ซับสเตรตผสมระหว่างน้ำตาลทรายกับกรดและเกลือของกรดบางชนิด พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตรร่วมกับโซเดียมวาเลอเรตปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิตสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ได้สูง เท่ากับ 22 โมลเปอร์เซ็นต์และ 35.18 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ โดยโมโนเมอร์ 3HV เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อซึ่งสูงสุดเท่ากับ 26 โมลเปอร์เซ็นต์ที่ 60 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตรร่วมกับโซเดียมโพรพิโอเนต 5 กรัมต่อลิตรได้สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV รองลงมาเท่ากับ 20 โมลเปอร์เซ็นต์และ 32.18 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

5. การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจน พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 สามารถใช้ยูเรียเป็นซับสเตรตได้และให้ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์และสารสกัดจากยีสต์ โดยได้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงสุด เท่ากับ 24 โมลเปอร์เซ็นต์และ 50.44 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีปริมาณยูเรียต่ำคือ C/N เท่ากับ 500 โมลต่อโมล

6. ภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 เพื่อผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV พบว่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 7.5 - 8.5 ทำให้ได้สัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 7 ถึง 9 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าที่ pH ต่ำกว่านี้ และปริมาณอากาศในการเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ที่อยู่ในระดับปานกลางโดยมีปริมาตรอาหารเท่ากับ 50 ถึง 75 มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ทำให้ได้สัดส่วนของ 3HV ที่สูงกว่า ปริมาณอากาศที่ให้สูงหรือต่ำกว่านี้ และที่ปริมาตรอาหารเท่ากับ 75 มิลลิลิตร ทำให้ผลิต PHBV ได้สูงสุดเท่ากับ 44.23 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

7. การจำกัดปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 พบว่า มีผลต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ส่วนการจำกัดปริมาณโพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตนั้นไม่มีผลต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV

8. การเติมโซเดียมซิเตรตเป็นซับสเตรตมีผลให้ *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตโคพอลิเมอร์เพิ่มสูงขึ้นโดยได้ปริมาณและน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด เท่ากับ 55.35 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ 4.36 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ได้สัดส่วนของ 3HV เพียง 7 โมลเปอร์เซ็นต์

9. การเติมเมทไธโอนีนเป็นซับสเตรตมีผลให้ *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีสัดส่วนของ 3HV สูงกว่ากรดอะมิโนชนิดอื่นที่ศึกษาและชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมกรดอะมิโน แต่ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ต่ำกว่า

10. สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ที่เหมาะสม คือ อาหาร MSM (Mineral Salt Medium) ซึ่งได้ปรับปรุงโดยผลจากการศึกษานี้ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำตาลทราย	**15.0**	**กรัม**
โซเดียมวาเลอเรต	**5.0**	**กรัม**
ยูเรีย	**0.05**	**กรัม**
โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	**3.0**	**กรัม**
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.1	กรัม
สารละลาย trace element	1.0	มิลลิลิตร

โดยใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 75 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.5 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที