บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบการเจริญของ *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 เมื่ออยู่ในอาหารสูตรเกลือแร่ E (ข้อ 2.3.2) ที่มีแหล่งไนโตรเจนถูกจำกัดและคงที่ แต่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ คือ กลูโคสอย่างเดียว โซเดียมออกตาโนเอตอย่างเดียว และกลูโคสร่วมกับโซเดียมออกตาโนเอต (รูปที่ 3-2) เซลล์มีการเจริญดี มีระยะพักสั้น พบว่าในช่วงต้นเซลล์มีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเซลล์เริ่มแล้วเข้าสู่ระยะการเจริญคงพบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 รูปแบบเซลล์มีอัตราการเจริญที่แตกต่างกัน จะเห็นได้ว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสนั้น เซลล์สามารถใช้กลูโคสในการเมตาบอลิซึม ผ่านเข้าสู่ Enter Doudoroff pathway และวัฏจักร TCA เปลี่ยนแปลงเป็นพลังงานได้โดยตรง (รูปที่ 4-1) ส่วนในอาหารที่มีโซเดียมออกตาโนเอตนั้น จากการศึกษาของ Huijberts,G.M. และคณะ (1994) พบว่าการเมตาบอลิซึมของโซเดียมออกตาโนเอตไม่ได้ผ่านเข้าสู่ Enter Doudoroff pathway แต่กลไกการสร้างเกิดขึ้นผ่านกระบวนการβ-oxidation และกระบวนการ de novo fatty acid biosynthesis และเนื่องจากความเข้มข้นของกลูโคส (10 กรัม/ลิตร)ที่ใช้นั้นมากกว่าโซเดียมออกตาโนเอต (10 มิลลิโมลาร์ หรือ 1.66 กรัม/ลิตร)มาก เซลล์จึงมีการเจริญดีในอาหารที่มีกลูโคส มากกว่าโซเดียมออกตาโนเอต และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนทั้ง 2 แหล่งอยู่ร่วมกัน เซลล์ย่อมสามารถเลือกใช้พลังงานได้จากหลายวัฏจักรในการสังเคราะห์เป็นผลให้เซลล์*Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเกลือแร่ E ที่มีกลูโคสและโซเดียมออกตาโนเอตอยู่ร่วมกันจะมีการเจริญดีที่สุดในกลุ่ม และในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเกลือแร่ E ที่มีเพียงโซเดียมออกตาโนเอต1.66 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเซลล์จึงมีการเจริญต่ำที่สุดในกลุ่ม

การสร้างพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตใน *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347

เนื่องจากกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก หาง่ายในท้องตลาด พบว่ายังไม่มีผู้ใดเคยรายงานว่า *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 สามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับสร้าง PHA ได้ และ pseudomonads บางสายพันธุ์สามารถใช้กลูโคสมาสร้าง

PHA ได้ ในขณะที่บางสายพันธุ์ไม่สามารถใช้กลูโคสมาสร้าง PHA แต่ใช้อัลคาโนเอตมาสร้าง PHA และมีบางสายพันธุ์สามารถใช้ได้ทั้งกลูโคสและอัลคาโนเอตมาสร้าง PHA ได้ เช่น *Pseudomonas putida* KT2442 และ *Pseudomonas cepacia* DSM 50181 เป็นต้น (ภาคผนวกที่ 12)

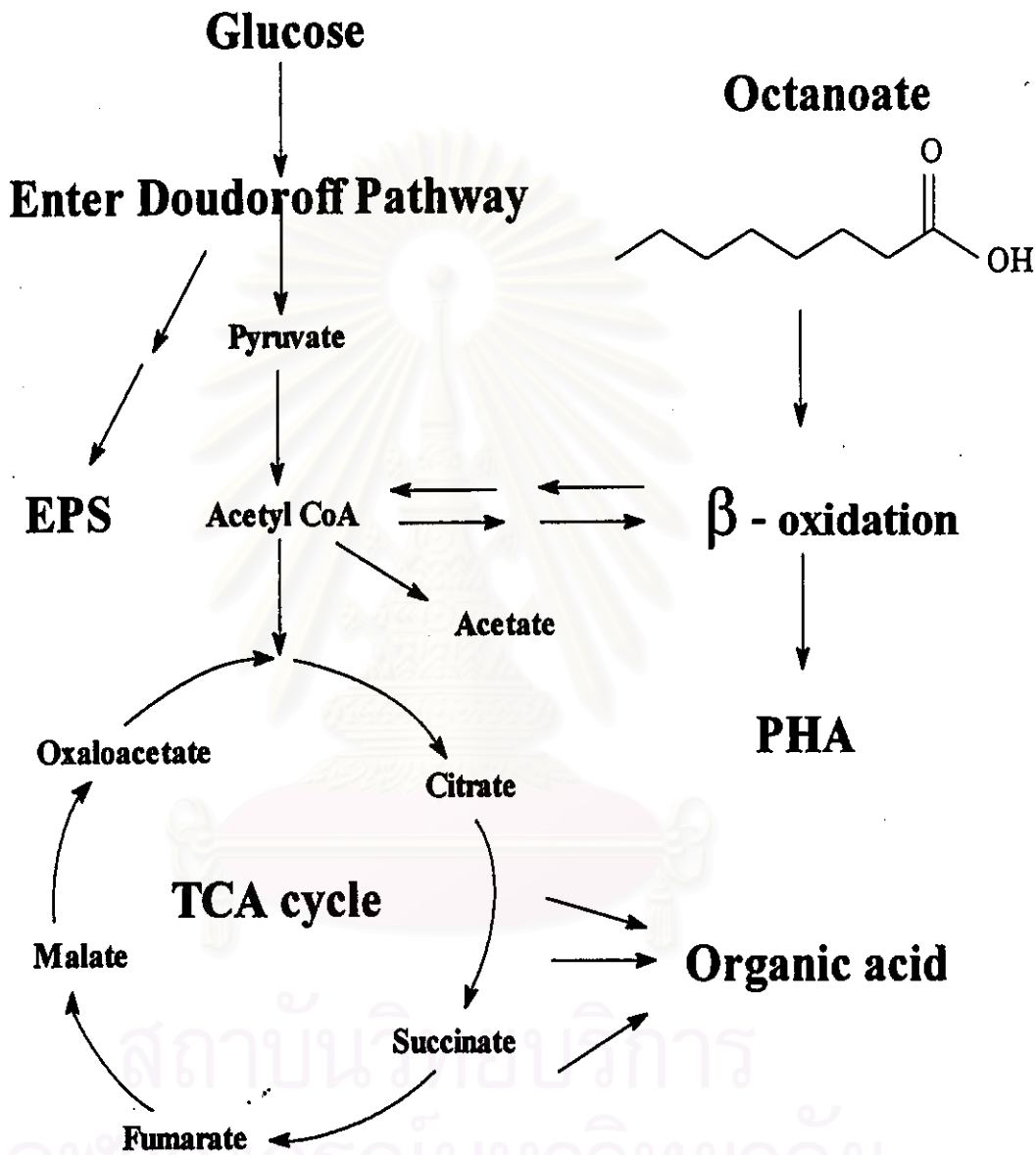
การทดลองนี้จึงทดลองใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วตรวจสอบสร้าง PHA ใน *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ผลการติดตามรูปแบบการเจริญและการผลิต PHA ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 4-1) เซลล์สามารถสร้าง PHA ได้ ในช่วงที่มีการเจริญแบบทวีคูณได้ปริมาณ PHA สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 ของการหมักได้ปริมาณ PHA ต่ำที่สุดในกลุ่ม (13.8 กรัมเปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักแห้ง) ภายหลังจากเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ ความสามารถของการสังเคราะห์ PHA จะลดลงอย่างรวดเร็ว อัตราการลดลงจะช้าลงเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ ที่ชั่วโมงที่ 36-60 ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์มีการปรับตัวเพื่อความอยู่รอด โดยการย่อยสายของพอลิเมอร์ (รูปที่ 1-3) ได้สายโมโนเมอร์อิสระเพื่อกลับไปสร้าง อะเซทิล โค เอ เข้าสู่วัฏจักร TCA เพื่อนำกลับไปสร้างพลังงานเพื่อการอยู่รอดภายในเซลล์ต่อไป และเนื่องจากกระบวนการสลายกลูโคสเพื่อมาสร้างพลังงานนั้นได้น้อย เซลล์จุลินทรีย์จึงมีการสะสม PHA ได้น้อยเช่นกัน

ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเกลือแร่ E ที่มีกลูโคสและโซเดียมออกตาโนเอตอยู่ร่วมกัน (รูปที่ 3-4) พบว่าเซลล์สามารถสร้าง PHA ได้ ในช่วงที่มีการเจริญแบบทวีคูณ ได้ปริมาณ PHA สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 ของการหมักเช่นเดียวกับในอาหารที่มีกลูโคส ภายหลังจากเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ความสามารถของการสังเคราะห์ PHA จะลดลงอย่างรวดเร็ว อัตราการลดลงจะช้าลงเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ ที่ชั่วโมงที่ 36 เป็นต้นไป ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์มีการปรับตัวเพื่อความอยู่รอด โดยเกิดกลไกเช่นเดียวกับในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเกลือแร่ E ที่มีกลูโคสเพียงอย่างเดียว และเหตุที่ได้ PHA มากกว่าอาจเนื่องมาจากเซลล์ได้รับแหล่งคาร์บอนถึง 2 แหล่ง เซลล์จึงมีการสะสม PHA ได้มากกว่าเมื่อเลี้ยง *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ในอาหารที่มีกลูโคสอย่างเดียว แต่เหตุที่ได้ปริมาณ PHA น้อยกว่าในอาหารที่มีโซเดียมออกตาโนเอตอย่างเดียวนั้น เพราะเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสร่วมกับโซเดียมออกตาโนเอตแล้วสารชีวภาพส่วนหนึ่งได้มีการเปลี่ยนไปเป็นกรดอินทรีย์ด้วยในขณะที่ในอาหารที่มีโซเดียมออกตาโนเอต อย่างเดียวนั้นไม่ได้ถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอินทรีย์ (พบกรดอินทรีย์ในอัตราที่ต่ำมาก)

ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเกลือแร่ E ที่มีโซเดียมออกตาโนเอตเพียงอย่างเดียว พบว่าเซลล์สามารถสร้าง PHA ได้ในช่วงที่มีการเจริญแบบทวีคูณได้ปริมาณ PHA สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 30 ของการหมัก ซึ่งช้ากว่าในอาหารที่มีกลูโคสอย่างเดียว และในอาหารที่มีกลูโคสร่วมกับโซเดียมออกตาโนเอต คิดเป็นปริมาณ PHA สูงที่สุดในกลุ่ม(33.3 กรัมเปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักแห้ง) ภายหลังจากเซลล์เริ่มเข้าสู่การเจริญคงที่ความสามารถของการสังเคราะห์ PHA จะลดลงอย่างรวดเร็ว อัตราการลดลงจะช้าลงเมื่อเซลล์เข้าสู่การเจริญคงที่เป็นต้นไป ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์มีการปรับตัวเพื่อความอยู่รอด โดยเกิดกลไกเช่นเดียวกับในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สูตรเกลือแร่ข้างต้น แต่เหตุที่เกิดช้ากว่าอาจเนื่องมาจากเซลล์ยังสามารถใช้โซเดียมออกตาโนเอตในการเจริญและสะสม PHA ได้จากกระบวนการ β-oxidation และกระบวนการ de novo fatty acid biosynthesis ซึ่งเป็นกระบวนการสังเคราะห์PHAโดยตรง และได้พลังงานมาก เซลล์จุลินทรีย์จึงมีการสะสม PHA ได้มากกว่าเมื่อเลี้ยง *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ในอาหารทั้ง 2 สูตรข้างต้น อีกทั้งเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมออกตาโนเอตอย่างเดียวนั้น สารชีวภาพไม่ได้มีการเปลี่ยนไปเป็น EPS เลยและเปลี่ยนไปเป็นกรดอินทรีย์ในอัตราที่ต่ำมาก

รูปแบบการเจริญและการผลิต PHA ของ *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ในอาหารทั้ง 3 สูตรข้างต้นนั้นคล้ายกับเมื่อเลี้ยง *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 นี้ในอาหารสูตรเกลือแร่ E ที่มีแหล่งคาร์บอนคือ นอร์มอล-ออกเทน 20%v/v โดยการจำกัดไนโตรเจน ตามที่ Lageveen และคณะ (1988) ได้เคยรายงานไว้ (รูปที่ 4-2) จากรูป จะเห็นว่าเมื่อให้อาหารที่มีไนโตรเจนถูกจำกัด กับอาหารที่มีไนโตรเจนเกินพอ ลักษณะการเจริญของ *Pseudomonas oleovorans* ในช่วงต้น เซลล์มีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเซลล์เริ่มแล้วเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 รูปแบบ เซลล์มีการเจริญแตกต่างกัน ได้มวลเซลล์แตกต่างกัน คล้ายกับเมื่อเลี้ยง *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 นี้ในอาหารสูตรเกลือแร่ E ทั้ง 3 รูปแบบในงานวิจัยนี้ นอกจากนั้นจะเห็นว่าเมื่อพิจารณารูปแบบการผลิต PHA นั้น เซลล์สามารถสร้าง PHA ได้ ในช่วงที่มีการเจริญแบบทวีคูณ ได้ปริมาณ PHA สูงสุดในช่วง 24-30 ชั่วโมงของการหมัก ภายหลังจากเซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ ความสามารถของการสังเคราะห์ PHA จะลดลงเรื่อยๆ ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยนี้ แต่งานวิจัยของ Lageveen และคณะ (1988) เป็นการเปรียบเทียบการจำกัดแหล่งไนโตรเจน แต่งานวิจัยนี้เป็นการเปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน เพื่อดูการสลายอาหารคาร์บอนในวัฏจักรที่ต่างกันของจุลินทรีย์

รูปที่ 4-1 วัฏจักรการสลายแหล่งคาร์บอนกลูโคสและออกตาโนเอต ใน *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347



ตารางที่ 4-1 การสร้าง PHA จากแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด ใน *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347

Carbon source	PHA (%w/w)	Polymer composition (mol%)						Reference
		3HB	3HV	3HHx	3HO	3HD	3HDD	
Hexanoate	22	3	<1	72	22	3	0	Gross และคณะ, 1989
Octanoate	41	<1	1	6	75	17	0	
Decanoate	37	<1	1	7	44	47	<1	
20 mM Butyrate	-[a]	0	0	0	0	33	67	Huisman และคณะ, 1989
20 mM Valerate	-	0	0	0	0	35	65	
10 mM Octanoate	-	0	0	8	91	1	0	
0.5% Octanoate	44	0	0	5.4	92	2.6	0	Timm และ Steinbuchel, 1990
10 mM Octanoate	33.3	0	5	9	84	2	0	งานวิจัยนี้
10 mM Octanoate plus 1% Glucose	26.9	0	4	10	79	2	5	
1% Glucose	13.8	0	0	0	3	6	91	

[a] data not report

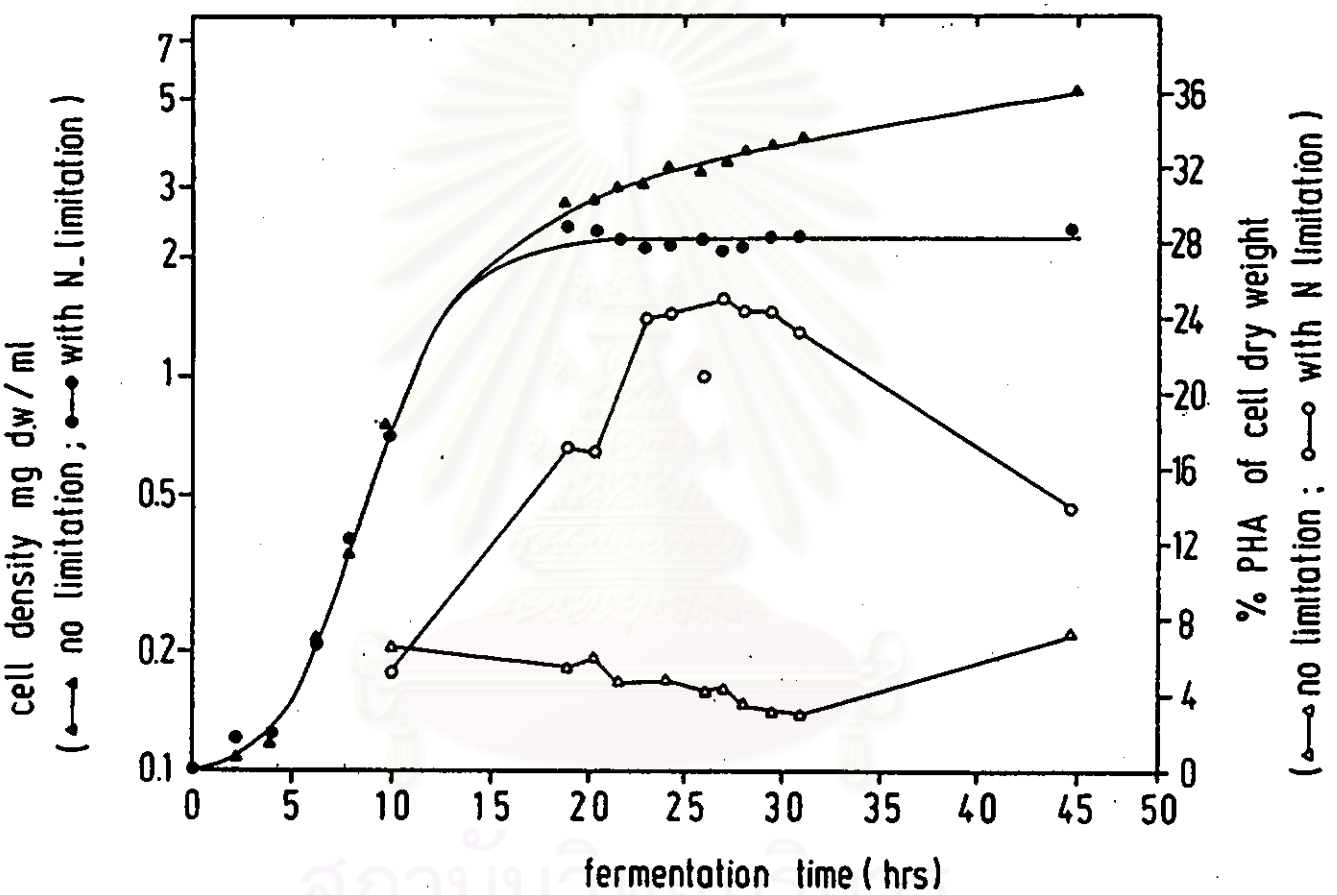
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อพิจารณาสัดส่วนพอลิเมอร์ตามวิธีการของ Brandl และคณะ (1988) (วิธีข้อ 2.10) ของ PHA ที่สกัดได้จาก *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ในอาหารสูตรเกลือแร่ทั้ง 3 รูปแบบ พบว่าในอาหารที่มีโซเดียมออกตาโนเอตอย่างเดียว และในอาหารที่มีกลูโคสร่วมกับโซเดียมออกตาโนเอตจะมีสัดส่วนพอลิเมอร์ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 3-3 และตารางที่ 4-1) คือมีกรด3-ไฮดรอกซีออกตาโนอิค (3HO) เป็นองค์ประกอบหลัก และมีกรด3-ไฮดรอกซีเฮกซาโนอิค (3HHx) เป็นองค์ประกอบรอง โดยในอาหารที่มีโซเดียมออกตาโนเอตอย่างเดียว จะมี 3HO 84 % และ 3HHx 9 % ส่วนในอาหารที่มีมีกลูโคสร่วมกับโซเดียมออกตาโนเอตจะมี 3HO 79 % และ 3HHx 10 % ส่วนในอาหารที่มีกลูโคสอย่างเดียว จะมีกรด3-ไฮดรอกซีโดเดคาโนอิค(3HDD) เป็นองค์ประกอบหลัก (91 %)

เมื่อพิจารณาสัดส่วนพอลิเมอร์ที่ได้ จะเห็นได้ว่าเมื่อเลี้ยง *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ในอาหารสูตรเกลือแร่ที่มีโซเดียมออกตาโนเอตอยู่ด้วยนั้นโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลักต่างก็เป็น 3-ไฮดรอกซีออกตาโนอิค ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ใช้โซเดียมออกตาโนเอต(C_8) ผ่านเข้ากระบวนการ β-oxidation แล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นโมโนเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซีออกตาโนอิค (C_8) ออกมาโดยตรงดังที่ Waard และคณะ (1993) ได้ศึกษาใน *Pseudomonas putida* KT2442 ในรูปที่ 4-3 และผลการวิเคราะห์สัดส่วนพอลิเมอร์ที่ได้นั้นก็ได้ก็ใกล้เคียงกับงานวิจัยที่ Gross และคณะ (1989) เคยรายงานมา ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสนั้น โมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ 3-ไฮดรอกซีโดเดคาโนอิคซึ่งมี12 คาร์บอน (C_{12}) กลไกการสังเคราะห์ยังไม่ทราบแน่ชัด ซึ่งยังคงต้องมีการศึกษากันต่อไป กลไกที่พอคาดการณ์ได้ในเวลานี้ เป็นดังนี้ คือ *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 อาจใช้กลูโคสผ่านเข้าสู่ Enter Doudoroff pathway แล้วสร้างไพรูเวท ได้อะเซทิล โค เอ จากนั้นเกิดการรวมกัน(condensation) ของ อะเซทิล โค เอ จนได้เป็นโมโนเมอร์ 3-hydroxyfatty acid ที่มีคาร์บอนเป็นจำนวนคู่ออกมาออกมา แต่เหตุที่ได้ 3-ไฮดรอกซีโดเดคาโนอิคออกมาซึ่งไม่เหมือนเมื่อเลี้ยง *Pseudomonas* spp. NCIMB 40135 (Timm และ Steinbuchel, 1990) ที่จะได้ 3-ไฮดรอกซีเดคาโนอิค(C_{10}) เป็นองค์ประกอบหลัก(76%) (ภาคผนวกที่ 12) อาจเป็นเพราะเป็นลักษณะเฉพาะของ *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 นี้ก็ได้

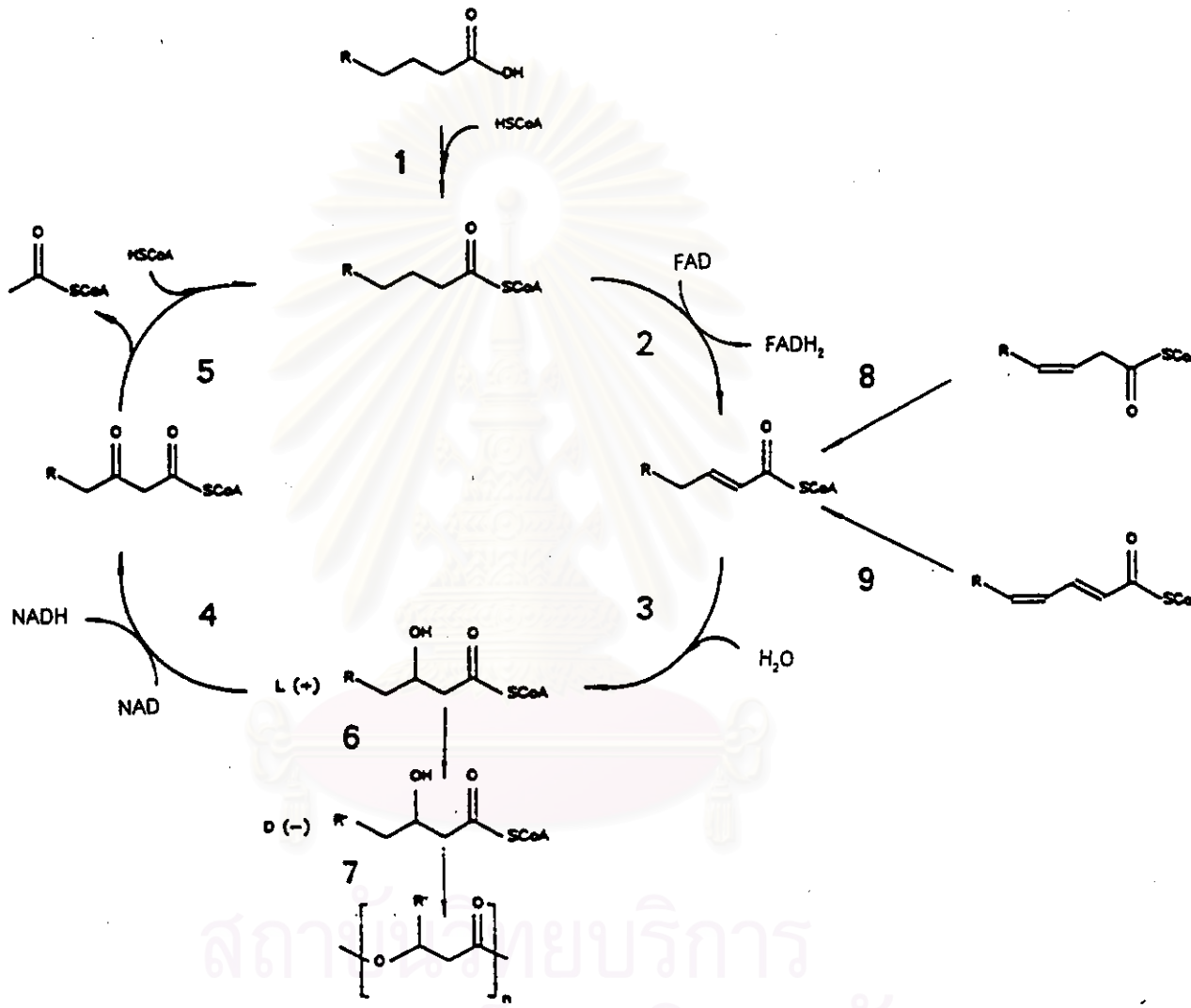
รูปที่ 4-2 การสร้าง PHA ใน *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 จากอาหารสูตรเกลือแร่ E ที่มีแหล่งคาร์บอนคือ นอร์มอล-ออกเทน 20%v/v ใน 2 รูปแบบ คือ โดยการจำกัดแหล่งไนโตรเจน และการให้แหล่งไนโตรเจนที่เพียงพอ

(Lageveen และคณะ, 1988)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4-3 วัฏจักรการสร้าง PHA ใน *Pseudomonas putida* KT2442 จากอาหารสูตรเกลือแร่ E ที่มีแหล่งคาร์บอนคือ กรดไขมันสายยาว ติดตามการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ ^{13}C NMR (Waard และคณะ, 1993)



1,acyl-CoA synthetase; 2, acyl-CoA dehydrogenase; 3, enol CoA hydratase; 4, 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase; 5, 3-ketoacyl-CoA thiolase; 6, 3-hydroxyacyl CoA epimerase; 7, PHA polymerase; 8, cis-3, trans-2, enol CoA isomerase; 9, 2,4-dienoyl CoA reductase.

เมื่อนำ PHA มาวิเคราะห์พิสูจน์คุณสมบัติทางเคมีด้วยเครื่องฟอร์เรียร์ทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ ในช่วงความถี่ 400 – 4000 cm^{-1} เมื่อพิจารณาอินฟราเรดสเปกตรัมจาก PHA ที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ในอาหารสูตรเกลือแร่ E ที่มีแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 รูปแบบ พบว่าเป็นอินฟราเรดสเปกตรัมของ PHA จริง โดยอินฟราเรดสเปกตรัมจาก PHA ที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ในอาหารสูตรเกลือแร่ E ที่มีโซเดียมออกตาโนเอตเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 3-14) แสดงให้เห็นว่ามี หมู่ alkyl (202 cm^{-1}), มี carboxylic acid ester(1401 cm^{-1}) แสดงให้เห็นว่ามีaliphatic และเป็นสารประกอบประเภทเอสเทอร์ (4925cm^{-1}) อันบ่งบอกว่าเป็นPHAจริง ส่วนอินฟราเรดสเปกตรัมจาก PHA ที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ในอาหารสูตรเกลือแร่ E ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน(รูปที่ 3-13) แสดงให้เห็นว่ามีหมู่ alkyl (202 cm^{-1}), มี aliphatic carboxylic acid (1201 cm^{-1}), มี dicarboxylic acid หรือ low molecular weight acid (1202 cm^{-1}), และมีสารประเภท carbonlyl compound (4923 cm^{-1}) ส่วนอินฟราเรดสเปกตรัมจาก PHA ที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ในอาหารสูตรเกลือแร่ E ที่มีกลูโคสและโซเดียมออกตาโนเอตเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 3-15) แสดงให้เห็นว่ามีหมู่alkyl (202 และ 208 cm^{-1}), มีcarboxylic acid ester (1402 cm^{-1}) แสดงให้เห็นว่ามี aliphatic และเป็นสารประกอบประเภทเอสเทอร์ (4925 cm^{-1}) อันบ่งบอกว่าเป็น PHA จริงเช่นเดียวกัน อินฟราเรดสเปกตรัมจากPHA ที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ในอาหารสูตรเกลือแร่ E ที่มีแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 รูปแบบคล้ายคลึงกับอินฟราเรดสเปกตรัมจากPHAที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ในอาหารสูตรเกลือแร่ E ที่มีแหล่งคาร์บอน เป็นออกเทนดังรูปในภาคผนวกที่ 13 (Lageveen และคณะ, 1988) และ 14 (De Smet และคณะ, 1983)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสร้างเอกโซพอลิแซคคาไรด์ใน *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347

จุลินทรีย์ในสกุล pseudomonads นั้นมีความสามารถในการสร้างสารชีวภาพอื่นนอกเหนือจากพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต จึงก่อให้เกิดแนวคิดที่ว่า ในสภาวะการหมักเพื่อผลิต PHA เมื่อปั่นแยกจุลินทรีย์เพื่อนำไปสกัด PHA นั้น น้ำหมักที่เหลือเราน่าจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์อย่างใดได้บ้าง เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

จากการตารางที่4-2พบว่ามีpseudomonadsหลายสายพันธุ์สามารถสร้างพอลิแซคคาไรด์ที่ขับออกมาภายนอกเซลล์ (EPS) แต่ยังไม่มีผู้ใดเคยรายงานว่า *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 สามารถสังเคราะห์ EPS ภายใต้สภาวะการเลี้ยงเชื้อเพื่อส่งเสริมการผลิต PHA ได้ งานวิจัยนี้จึงทดลองตรวจสอบการสร้าง EPS แล้ววิเคราะห์ปริมาณEPSวิธีฟีนอล-ซัลฟุริคตามวิธีของ Dubois(1956) (วิธีข้อ 2.11)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4-2 การสร้าง PHA และEPS ใน *Pseudomonas* spp.

Strain	Medium	PHA		EPS		Reference
		yield	Polymer composition	Yield (%w/v)	Polymer composition หรือชนิดของ EPS	
Pseudomonas oleovorans ATCC29347	E[a] +Octanoate	41	3HO 75%, 3HD 17%	0	0	Gross และคณะ, 1989
	E+Octanoate+ Glucose	26.9	3HO 79%, 3HHx 10%, 3HD 2%	0.8	Maltose(glu+glu)	งานวิจัยนี้
	E+Glucose	13.8	3HDD 91%	1.2	Maltose(glu+glu)	
P. fluorescens J1	Pseudomonas agar F+glycerol	-[b]	-	3.5-7.0	Glucose+Mannose (EPS ชนิด alginate)	Fett และคณะ, 1995
P. fluorescens H13	Pseudomonas agar F+glycerol	-	-	0.7-3.0	EPS ชนิด unique	
P. reactans ATCC 14340	Pseudomonas agar F+glycerol	-	-	1.2-5.5	Glucose+Mannose (EPS ชนิด alginate)	
P. fluorescens DSM 50108	E+ Octanoate	19.1	3HO 86.9%, 3HD 13.1%	-	-	Timm และ Steinbuchel,1990

ตารางที่ 4-2 (ต่อ) การสร้าง PHA และEPS ใน *Pseudomonas* spp.

Strain	Medium	PHA		EPS		Reference
		yield	Polymer composition	Yield (%w/v)	Polymer composition หรือชนิดของ EPS	
P. putida all strain	Pseudomonas agar F+glycerol	-	-	2.5-5.8	Glucose (EPS ชนิด marginalan)	Fett และคณะ, 1995
P. putida DSM 291	E+Octanoate	40.3	3HO 89.6%, 3HD 5.4%	-	-	Timm และ Steinbuchel,1990

[a]E medium(Lageveen,1988), [b]data not report

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิเคราะห์พบว่าเมื่อเลี้ยง*Pseudomonas oleovorans* ATCC29347 ในอาหารสูตรเกลือแร่ E (ข้อ 2.3.2)ที่มีกลูโคสอย่างเดียว และในอาหารที่มีกลูโคสร่วมกับโซเดียมออกตาโนเอตเท่านั้นที่เซลล์จะสามารถสังเคราะห์ EPS ได้ โดยในอาหารสูตรเกลือแร่ E ที่มีกลูโคสอย่างเดียว รูปแบบการสร้าง EPS (รูปที่3-9) จะค่อยๆเพิ่มสูงขึ้นในระยะกึ่งกลางการเจริญแบบทวีคูณ และให้ EPS สูงสุดในช่วงต้นของระยะการเจริญคงที่ โดยให้ปริมาณ EPS สูงสุดในชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก (8 กรัม/ลิตร) และการสังเคราะห์ EPS จะค่อยๆลดลงในอัตราคงที่เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ สาเหตุที่อัตราการสังเคราะห์ลดลงอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์มีการปรับตัวโดยลดกระบวนการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็น EPS ใน Enter Doudoroff pathway ลงเมื่อแหล่งอาหารเริ่มหมดเพื่อการอยู่รอด ส่วนในอาหารสูตรเกลือแร่ E ที่มีกลูโคสร่วมกับโซเดียมออกตาโนเอตการสร้าง EPS (รูปที่ 3-10) ก็มีรูปแบบเช่นเดียวกับเมื่อเลี้ยง *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ในอาหารสูตรเกลือแร่ E ที่มีกลูโคสอย่างเดียว โดยให้ปริมาณ EPS สูงสุดในชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก (12 กรัม/ลิตร) สูงกว่าเมื่อเลี้ยงโดยกลูโคสอย่างเดียว ซึ่งอาจเนื่องมาจากว่ามีแหล่งคาร์บอนถึง 2 แหล่งเซลล์จึงไม่จำเป็นต้องรีบเปลี่ยนแหล่งอาหารเป็นพลังงาน เซลล์จึงมีการสร้าง EPS ได้มากกว่าในอาหารที่มีเพียงกลูโคสอย่างเดียว ส่วนในอาหารสูตรเกลือแร่ E ที่มีโซเดียมออกตาโนเอตอย่างเดียว ไม่พบการสร้าง EPS ทั้งนี้เพราะเซลล์ไม่สามารถเปลี่ยนออกตาโนเอตไปเป็นน้ำตาลเฮกโซสเพื่อเข้าสู่วัฏจักรการสังเคราะห์EPSในEnter Doudoroff pathway ได้

เมื่อวิเคราะห์สัดส่วนพอลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในพอลิแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งจุลินทรีย์ในสกุล pseudomonads ส่วนใหญ่จะสังเคราะห์ได้ในรูปแบบ MM(Man+Man), MG(Man+Glu) หรือ GG (Glu+Glu) block อย่างใดอย่างหนึ่ง (Fett และคณะ,1995) ในงานวิจัยนี้พบว่า เมื่อเลี้ยง *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ในอาหารสูตรเกลือแร่ E (ข้อ 2.3.2) ที่มีกลูโคสอย่างเดียว, และในอาหารที่มีกลูโคสร่วมกับโซเดียมออกตาโนเอตต่างก็มีมอลโตสเป็นองค์ประกอบ(เป็นแบบ GG block) ซึ่งคล้ายกับที่ Fett และคณะ(1995) ที่ศึกษาจุลินทรีย์ในสกุล pseudomonads สายพันธุ์ต่างๆ (ตารางที่ 1-5) พบว่า *Pseudomonas putida* ทุกสายพันธุ์สามารถสังเคราะห์ EPS ชนิด marginalan ได้ ซึ่ง marginalan นั้นมี กลูโคสเป็นองค์ประกอบหลัก (รูปที่ 1-10 ค) (เป็นพอลิเมอร์แบบ GG block) สำหรับ *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ที่ศึกษานี้อาจจะสร้าง EPS ชนิด marginalan ก็ได้ ผลการวิเคราะห์อินฟราเรดสเปกตรัม(รูปที่ 3-16 และ 3-17) สามารถบอกได้ว่าเพียงว่าเป็นสารประกอบที่มี H-bond (404 cm^{-1}) และมีกรดเป็นส่วนประกอบ (252 cm^{-1}) ซึ่ง marginalan นั้นโครงสร้างส่วน

หนึ่งก็มีหมู่ carboxyl อยู่ อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการศึกษาเพื่อวิเคราะห์ชนิดของ EPS อาจจะต้องใช้ ^{13}C-กลูโคส แล้วตรวจวัดด้วย NMR หรือด้วยเครื่องมือที่มีคุณภาพต่อไป

การสร้างกรดอินทรีย์ใน *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347

นอกเหนือจากการสร้าง EPS ใน *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 แล้วผู้วิจัยได้ทดลองนำน้ำใสที่ได้จากการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตรไปทดสอบหากรดอินทรีย์อื่นๆ เนื่องจากเมื่อวัด pH ในน้ำหมักพบว่า น้ำหมักมีฤทธิ์เป็นกรดเล็กน้อย (pH อยู่ระหว่าง 6.5-7) ผู้วิจัยจึงทดลองนำน้ำใสที่ผ่านการปั่นแยกเซลล์แล้ว (ข้อ 2.8.1) มาวิเคราะห์หากรดอินทรีย์โดยเครื่อง HPLC โดยใช้สภาวะตามข้อ 2.14 จะเห็นได้ว่าในอาหารสูตรเกลือแร่ E ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นจะมีกรดซัคซินิก และกรดอะซิติกสูงกว่ากรดไตรคาร์บอกซิลิกอื่น ในอาหารสูตรเกลือแร่ E ที่มีกลูโคสและโซเดียมออกตาโนเอตร่วมกันเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นจะมีกรดซิตริกและกรดอะซิติกสูงกว่ากรดไตรคาร์บอกซิลิกอื่น ส่วนในอาหารสูตรเกลือแร่Eที่มีโซเดียมออกตาโนเอตเป็นแหล่งคาร์บอนอย่างเดียวนั้นจะมีกรดไตรคาร์บอกซิลิกต่ำที่สุดในกลุ่ม

จะเห็นได้ว่าในอาหารที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยนั้น จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดไตรคาร์บอกซิลิกมากกว่าเมื่อไม่มีกลูโคสประกอบอยู่ด้วย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะจุลินทรีย์สามารถใช้กลูโคสในการเจริญเข้าสู่ Enter Doudoroff pathway แล้วเข้าสู่วัฏจักร TCA ให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดไตรคาร์บอกซิลิกออกมาโดยตรง (รูปที่ 4-1) ส่วนในอาหารที่มีโซเดียมออกตาโนเอตจะให้กรดไตรคาร์บอกซิลิกน้อยนั้น เนื่องจากว่าจุลินทรีย์ไม่ได้ใช้โซเดียมออกตาโนเอตผ่านเข้าสู่วัฏจักร TCA แต่ใช้โซเดียมออกตาโนเอตผ่านเข้าสู่กระบวนการ β-oxidation และกระบวนการ de novo fatty acid biosynthesis กรดไตรคาร์บอกซิลิกจึงวิเคราะห์พบได้น้อยมาก ในอาหารสูตรที่มีกลูโคสและโซเดียมออกตาโนเอตร่วมกันเป็นองค์ประกอบนั้น กรดไตรคาร์บอกซิลิกส่วนใหญ่ที่พบคือ กรดอะซิติก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะจุลินทรีย์สามารถสลายกลูโคสเข้าสู่วัฏจักร Enter Doudoroff pathway แล้วได้กรดอะซิติกออกมา และยังสามารถใช้โซเดียมออกตาโนเอตเข้าสู่กระบวนการβ-oxidation ได้อะเซทิลโค เอ อิสระ แล้วเปลี่ยนไปเป็นอะซิเตต จึงพบอะซิเตตออกมาในน้ำหมักมากกว่ากรดชนิดอื่น และเนื่องจากยังมีแหล่งอาหารอยู่มากอะซิเตตจึงยังไม่ถูกเปลี่ยนไปเป็นสารอื่นเพื่อสร้างพลังงาน ส่วนในอาหารที่มีโซเดียมออกตาโนเอตอย่างเดียวนั้น

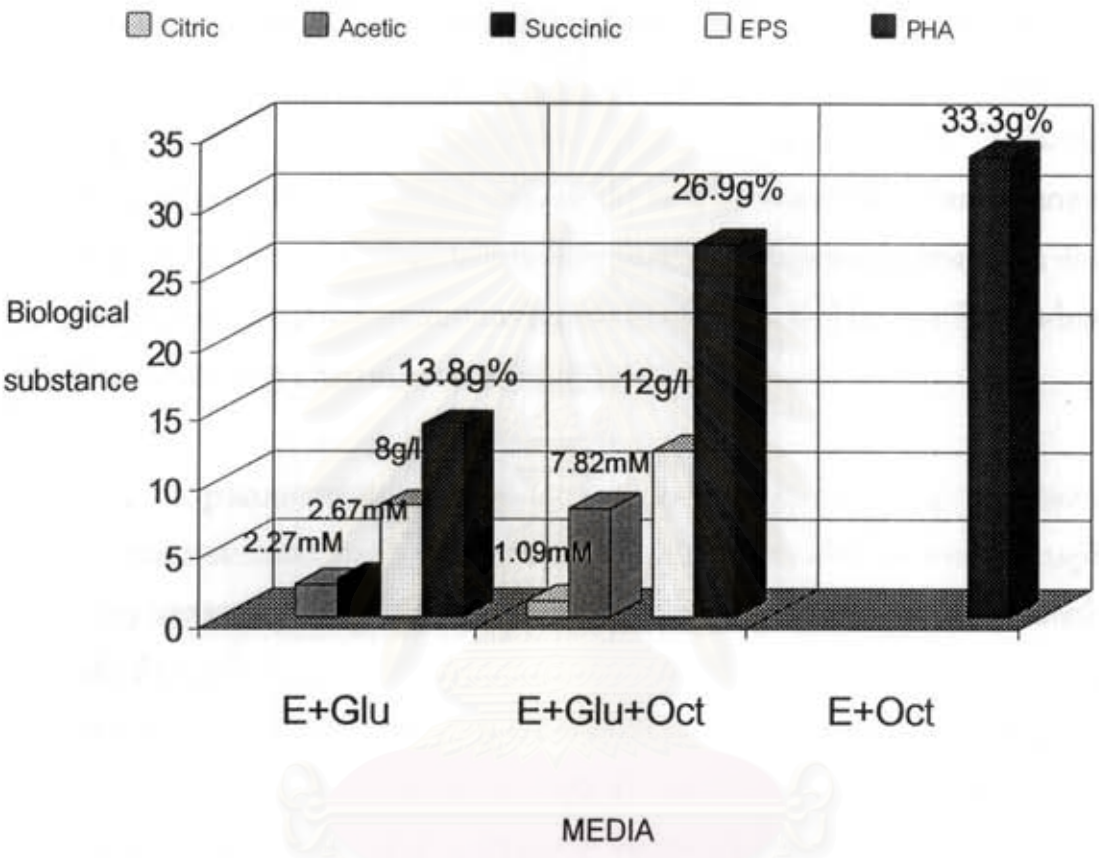
เซลล์จุลินทรีย์สามารถใช้โซเดียมออกตาโนเอตเข้าสู่กระบวนการ β-oxidation ได้เส้นทางหลักทางเดียวจึงอาจมีการเร่งนำอะเซทิล โค เอ ที่ได้เข้าสู่กระบวนการ de novo fatty acid biosynthesisต่อ อันเป็นการปรับตัวเพื่อการอยู่รอดเพื่อสร้างพลังงานเข้าเซลล์เนื่องจากมีแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว กรดอะซิติกจึงพบได้น้อยในน้ำหมัก

ส่วนกรดซิตริกที่พบมากในอาหารที่มีกลูโคสร่วมกับโซเดียมออกตาโนเอตนั้นอาจเนื่องมาจากในวัฏจักร TCA กรดซิตริกซึ่งเป็นสาร intermediate ตัวแรกไม่ได้มารวมกับ อะเซทิล โค เอ แต่อะเซทิล โค เอ จะถูกเปลี่ยนไปเป็นอะซิเตตส่วนหนึ่ง และเข้าสู่กระบวนการ de novo fatty acid biosynthesis อีกส่วนหนึ่ง ทำให้กรดซิตริกพบได้มากในน้ำหมัก

ส่วนกรดซัคซินิกที่พบมากในอาหารที่มีกลูโคสอย่างเดียวนั้นอาจเนื่องมาจากในวัฏจักร TCA กรดซิตริกได้ถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดซัคซินิกซึ่งเป็นสาร intermediateตัวที่ 2 แล้วและในช่วงเวลาชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก อาจเป็นเวลาที่วัฏจักรหมุนเวียนมาตรงจุดที่ได้กรดซัคซินิกพอดี ทำให้กรดซัคซินิกพบได้มากในน้ำหมัก อย่างไรก็ตามในอนาคตควรจะมีการติดตามการสร้างกรดอินทรีย์ในทุกช่วงเวลา เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงเวลาทั้งหมด นำไปสู่การอธิบายที่แม่นยำมากขึ้นต่อไป

จะเห็นได้ว่าเมื่อเลี้ยง *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ในอาหารสูตรเกลือแร่ E ที่มีกลูโคสร่วมเป็นแหล่งคาร์บอนด้วย จะได้สารชีวภาพมากกว่าหนึ่งอย่าง ซึ่งกลูโคสนั้นเป็นสารอาหารที่มีราคาถูกกว่าออกตาโนเอตและกรดไขมันต่างๆ ซึ่งหากได้มีการปรับปรุงสภาวะการผลิตที่ดีต่อไป เช่น ทดลองเลี้ยง *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ในกรดไขมันต่างๆ ร่วมกับน้ำตาลกลูโคส แมนโนส ฟรุกโตส หรือน้ำตาลอื่น แล้วติดตามสารชีวภาพที่เซลล์สร้างขึ้น ย่อมจะสามารถควบคุมสภาวะการผลิตให้ *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 สามารถผลิตสารชีวภาพที่ต้องการได้ในปริมาณที่มากและหลากหลายชนิด อันจะส่งผลให้ต้นทุนการผลิตลดลงต่อไปในอนาคต

รูปที่ 4-4 สรุปผลการสร้างสารชีวภาพใน *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

1. รูปแบบการสังเคราะห์ PHA ใน *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ในสภาพการเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารสูตรเกลือแร่ E ที่มีแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 รูปแบบ พบว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน การสร้าง PHA จะเกิดควบคู่กับการเจริญ และสามารถสังเคราะห์ PHA ได้ปริมาณสูงสุดประมาณ 13.8 กรัมเปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักแห้ง ที่ชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก ภายหลังจากเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ ความสามารถของการสังเคราะห์ PHA จะลดลงอย่างรวดเร็ว อัตราการลดลงจะช้าลงเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ ที่ชั่วโมงที่ 36-60 โดย PHA ที่ได้มี 3-ไฮดรอกซีโดเดคาโนอิค(C_{12}) เป็นองค์ประกอบหลัก (91%)

2. รูปแบบการสังเคราะห์ PHA ใน *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 เมื่อใช้โซเดียมออกตาโนเอต (10 มิลลิโมลาร์)เป็นแหล่งคาร์บอน การสร้าง PHAจะเกิดควบคู่กับการเจริญ และสามารถสังเคราะห์ PHA ได้ปริมาณสูงสุดประมาณ 33.3 กรัมเปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักแห้ง ที่ชั่วโมงที่ 30 ของการหมัก ภายหลังจากเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ ความสามารถของการสังเคราะห์ PHA จะลดลงอย่างรวดเร็ว อัตราการลดลงจะช้าลงเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญคงที่เป็นต้นไป โดย PHAที่ได้มี 3-ไฮดรอกซีออกตาโนอิค(C_8) เป็นองค์ประกอบหลัก (84%) และมี 3-ไฮดรอกซีเฮกซาโนอิค(C_6) เป็นองค์ประกอบรอง (9%)

3. รูปแบบการสังเคราะห์ PHA ใน *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 เมื่อใช้กลูโคส (10 กรัม/ลิตร) และโซเดียมออกตาโนเอต (10 มิลลิโมลาร์)เป็นแหล่งคาร์บอน การสร้าง PHAจะเกิดควบคู่กับการเจริญ และสามารถสังเคราะห์ PHA ได้ปริมาณสูงสุดประมาณ 26.9 กรัมเปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักแห้ง ที่ชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก ภายหลังจากเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ ความสามารถของการสังเคราะห์ PHA จะลดลงอย่างรวดเร็ว อัตราการลดลงจะช้าลงเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ ที่ชั่วโมงที่ 36 เป็นต้นไป โดย PHAที่ได้มี 3-ไฮดรอกซีออกตาโนอิคเป็นองค์ประกอบหลัก (79%) และมี 3-ไฮดรอกซีเฮกซาโนอิคเป็นองค์ประกอบรอง (10%)

4. รูปแบบการสังเคราะห์ EPS ใน *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ในสภาพการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิต PHA ในอาหารสูตรเกลือแร่ E ที่มีแหล่งคาร์บอนทั้ง คือ กลูโคส และกลูโคสร่วมกับโซเดียมออกตาโนเอตเท่านั้นที่เซลล์สามารถสังเคราะห์ EPS ได้ โดยการสร้าง EPS จะเกิดควบคู่กับการเจริญ เช่นเดียวกับการสังเคราะห์ PHA ได้ปริมาณ EPS สูงสุดประมาณ 8 กรัม/ลิตร หรือ 0.8 %w/v ที่ชั่วโมงที่ 24 ของการหมักในอาหารที่มีกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนอย่างเดียว และได้ปริมาณ EPS สูงสุดประมาณ 12 กรัม/ลิตร หรือ 1.2 %w/v ที่ชั่วโมงที่ 24 ของการหมักในอาหารที่มีกลูโคสร่วมกับโซเดียมออกตาโนเอต เป็นแหล่งคาร์บอน

5.เมื่อนำน้ำใสที่ผ่านการปั่นแยกเซลล์ออกไปวิเคราะห์หากรดอินทรีย์ในชั่วโมงที่มีการสร้างPHA สูงที่สุด พบว่าในอาหารสูตรเกลือแร่ E ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนนั้นจะมีกรดซัคซินิก 2.67 มิลลิโมลาร์ และกรดอะซิติก 2.27 มิลลิโมลาร์ ในอาหารสูตรเกลือแร่ที่มีกลูโคสและโซเดียมออกตาโนเอตร่วมกันเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นจะมีกรดซิตริก 1.09 มิลลิโมลาร์ และกรดอะซิติก 7.82 มิลลิโมลาร์ ส่วนในอาหารสูตรเกลือแร่ที่มีโซเดียมออกตาโนเอตเป็นแหล่งคาร์บอนอย่างเดียวนั้นจะมีกรดอินทรีย์ในอัตราที่ต่ำมาก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย