บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของกรดอะมิโน กรดไขมัน และกรดอินทรีย์บางชนิด ที่กระตุ้นการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes* sp. A-04 เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเพิ่มความสามารถในการผลิต PHB โดย *Alcaligenes* sp. A-04 ต่อไป

4.1 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อ

ในการผลิต PHB ให้ได้ปริมาณมาก จำเป็นต้องมีการจำกัดปริมาณสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน (Byrom,1987) ดังนั้นถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยสารอาหารที่สมบูรณ์ เซลล์จะมีการเจริญเติบโตในภาวะที่สมดุล โดยสารอาหารจะถูกนำไปใช้ในการเจริญเติบโตมากกว่าการสังเคราะห์และสะสม PHB ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องเลี้ยงกล้าเชื้อเริ่มต้นให้ได้ปริมาณเซลล์มาก แล้วย้ายลงสู่อาหารสำหรับการสังเคราะห์และสะสม PHB ต่อไป งานวิจัยนี้จึงศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 เพื่อให้ได้เซลล์ปริมาณมาก ก่อนที่จะย้ายลงสู่อาหาร MSM เพื่อการสังเคราะห์และสะสม PHB โดยพิจารณาเปรียบเทียบจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ระยะเวลาต่าง ๆ ทุก 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อก่อนย้ายลงอาหาร MSM สำหรับการสังเคราะห์และสะสม PHB คือ 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ได้จากการศึกษารูปแบบของการเจริญเติบโต เนื่องจากที่เวลานี้ได้ปริมาณเซลล์มากกว่าที่เวลาอื่นและเซลล์อยู่ในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ จึงเลือกใช้กล้าเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงเพื่อใช้สำหรับการสังเคราะห์และสะสม PHB ในขั้นต่อไป

4.2 การศึกษาผลกระตุ้นของกรดอะมิโนที่มีต่อการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes* sp. A-04

4.2.1 ผลของกรดกลูตามิก กลูตามีน กรดแอสปาติก แอสปาราจีน โปรลีน ไลซีน ทรีโอนีน และซีสเตอีน ต่อการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes* sp. A-04

จากผลการวิจัยโดยใช้กรดอะมิโน 8 ชนิดดังกล่าวเป็นซับพลีเมนต์สำหรับการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes* sp. A-04 พบว่า ในอาหาร MSM ที่เติมกรดอะมิโนดังกล่าวในความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้ *Alcaligenes* sp. A-04 มีการเจริญเพิ่มขึ้น โดยเห็นได้จากน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่เพิ่มขึ้นในการทดลองที่เติมกรดกลูตามิก กลูตามีน กรดแอสปาติก แอสปาราจีน โปรลีน ไลซีน ทรีโอนีน และซีสเตอีน เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม (0.87 กรัมต่อลิตร) แต่พบว่า *Alcaligenes sp.* A-04 มีความสามารถในการสังเคราะห์และสะสม PHB ต่ำกว่าในการทดลองชุดควบคุมที่ได้ปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 68.96

เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยในการทดลองชุดควบคุมได้ปริมาณ PHB คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่าในการทดลองที่เติมกรดอะมิโนทั้ง 8 ชนิดได้แก่ กรดกลูตามิก(53 เปอร์เซ็นต์) กลูตามีน (53 เปอร์เซ็นต์) กรดแอสปาติก (54 เปอร์เซ็นต์) แอสปาราจีน (58 เปอร์เซ็นต์) โปรลีน (62 เปอร์เซ็นต์) ไลซีน (61 เปอร์เซ็นต์) ทรีโอนีน (61 เปอร์เซ็นต์) และซีสเตอีน (63 เปอร์เซ็นต์)

จากผลการวิจัยดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าการเติมกรดอะมิโนบางชนิด และในความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองนี้ มีผลทำให้การสังเคราะห์ และสะสม PHB โดย *Alcaligenes sp.*A-04 ได้ปริมาณต่ำกว่าชุดควบคุม ซึ่งอาจเปรียบเทียบกับผลงานที่ได้มีผู้วิจัยกลุ่มอื่นรายงานไว้ และมีข้อสันนิษฐานของผู้วิจัยเอง โดยสรุปได้ดังนี้ จากการวิจัยของ Lee และคณะ(1995) ที่ใช้รีคอมบิแนนท์ E. coli ในการผลิต PHB โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และศึกษาการเติมกรดอะมิโนชนิดต่างๆ รวมทั้งกรดอะมิโนทั้ง 8 ชนิดที่เป็นชนิดเดียวกันกับที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ พบว่าการเจริญเติบโต และการสังเคราะห์ PHB เพิ่มขึ้นในทุกการทดลอง ส่วนรายงานการวิจัยของ Lee และคณะ (1996) ที่ได้รายงานผลของซับพลีเมนต์ ได้แก่กรดอะมิโนบางชนิด เช่น กรดกลูตามิก กลูตามีน กรดแอสปาติก ที่มีผลต่อการสังเคราะห์ PHB โดย *Alcaligenes latus* เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่า กรดอะมิโนที่ใช้เป็นซับพลีเมนต์ทุกชนิดที่ศึกษาทำให้ *A. latus* มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น และสามารถสังเคราะห์ PHB ได้เพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต PHB เป็นอาหารซึ่งประกอบด้วยอนินทรีย์ไนโตรเจนปริมาณจำกัด ดังนั้นการเติมกรดอะมิโนซึ่งเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่สำคัญต่อกระบวนการเมตาโบลิสมของเซลล์ จึงอาจเป็นผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้นกว่าการไม่เติมกรดอะมิโน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดอะมิโน 4 ชนิด ได้แก่ กรดกลูตามิก กลูตามีน กรดแอสปาติก และแอสปาราจีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีบทบาทสำคัญต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ กลูตามีนและกรดแอสปาติกยังมีบทบาทสำคัญต่อการสังเคราะห์พิวรีน นิวคลีโอไทด์ (purine nucleotides) โดยทำหน้าที่เป็นสารให้ไนโตรเจน (nitrogen donor) ดังนั้นกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิดนี้ จึงทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตได้มากกว่ากรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ Kim และคณะ (1996)ได้รายงานว่าการใช้กรดอะมิโนบางชนิดเป็นซัพพลีเมนต์ เพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์ PHB โดย *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้ระดับความเข้มข้นของโคแฟกเตอร์ที่สำคัญต่อวิถีการสังเคราะห์ PHB เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยทำให้ระดับความเข้มข้นของ NAD(P)H มีค่าลดลง และ/หรือ ระดับความเข้มข้นของโคเอนไซม์เออิสระมีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งสนับสนุนรายงานการวิจัยของ Dawes และ Senior (1971) และ Oeding และ Schlegel (1973) ซึ่งรายงานว่า การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของระดับความเข้มข้นของโคเอนไซม์เออิสระและ/หรือ ระดับความเข้มข้นของ NAD(P)H จะเป็นปัจจัยที่ควบคุมการสังเคราะห์และสะสม PHB โดยระดับความเข้มข้นของโคเอนไซม์เออิสระที่เพิ่มขึ้นและ/หรือ ระดับความเข้มข้นของ NAD(P)H ที่ลดลง ทำให้การสังเคราะห์และสะสม PHB มีค่าลดลง ดังนั้นจากผลการ

ทดลองของงานวิจัยนี้ประกอบกับเหตุผลสนับสนุนของนักวิจัยทั้ง 3 กลุ่ม ทำให้ผู้วิจัยตั้งข้อสันนิษฐานว่า การเติมกรดอะมิโนทั้ง 8 ชนิดดังกล่าว อาจส่งผลให้ระดับความเข้มข้นของโคแฟกเตอร์ที่มีบทบาทสำคัญต่อวิถีการสังเคราะห์ของ PHB ภายในเซลล์ ของ *Alcaligenes sp.* A-04 เกิดความเปลี่ยนแปลงซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้มีผลในทางยับยั้งการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes sp.* A-04 ให้มีค่าลดลง

4.2.2 ผลของ ลิวซีน ไอโซลิวซีน อาร์จินีน และ เมทไธโอนีน ต่อการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes sp.* A-04

จากผลการวิจัยโดยใช้ ลิวซีน ไอโซลิวซีน อาร์จินีน และ เมทไธโอนีน เป็นซัพพลีเมนท์สำหรับการสังเคราะห์และสะสมของ PHB โดย *Alcaligenes sp.* A-04 พบว่า ในอาหาร MSM ที่เติมกรดอะมิโนดังกล่าวในความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้ *Alcaligenes sp.* A-04 มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น จากการเจริญเติบโตของการทดลองชุดควบคุม (0.87 กรัมต่อลิตร) และความสามารถในการสังเคราะห์และสะสม PHB มีค่าเพิ่มขึ้น จากการทดลองชุดควบคุมที่ได้ปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 68.96 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยในการทดลองชุดควบคุมได้ปริมาณ PHB คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้งต่ำกว่าในการทดลองที่เติมกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ลิวซีน (77%) ไอโซลิวซีน (75%) อาร์จินีน (73%) และเมทไธโอนีน (76%) เมื่อพบว่ากรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิดนี้ ทำให้ *Alcaligenes sp.* A-04 สามารถสังเคราะห์และสะสม PHB ได้มากกว่าการทดลองในชุดควบคุม ผู้วิจัยจึงได้นำกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิดนี้มาแปรผันระดับความเข้มข้น พบว่า ความเข้มข้นน้อยที่สุดของ ลิวซีน ไอโซลิวซีน อาร์จินีน และ เมทไธโอนีน ที่ทำให้ *Alcaligenes sp.* A-04 สังเคราะห์และสะสม PHB ได้สูงสุด คือ ระดับความเข้มข้น 125 50 75 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยให้ปริมาณ PHB มีค่าเท่ากับ 80 75 76 และ 76 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ

จากผลการวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การเติมกรดอะมิโนบางชนิดในความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองนี้ มีผลให้การสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes sp.* A-04 ได้ปริมาณสูงกว่าชุดควบคุม ซึ่งอาจเปรียบเทียบกับผลงานที่ได้มีผู้วิจัยกลุ่มอื่นรายงานไว้ และมีข้อสันนิษฐานของผู้วิจัยเองโดยสรุปได้ดังนี้ จากรายงานการวิจัยของ Lee และคณะ,(1995) ที่ศึกษาการผลิต PHB โดยรีคอมบิแนนท์ *E. coli* เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และศึกษาการเติมกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ รวมทั้งกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิดที่ได้ศึกษาในงานวิจัยนี้ พบว่า การเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิต PHB เพิ่มขึ้นในทุกการทดลอง ในปี 1996 Lee และคณะ ได้ศึกษาผลของเมตาโบไลซ์รวมทั้งกรดอะมิโนบางชนิดต่อการเติบโตและการสังเคราะห์ PHB โดย *Alcaligenes latus* เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยรายงานว่า การเติมลิวซีน ไอโซลิวซีน และ อาร์จินีน ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ *Alcaligenes latus* มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น และความสามารถในการสังเคราะห์ PHB มีค่าสูง

ขึ้นเช่นกัน เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Kim และคณะ,(1996) ได้รายงานถึงการศึกษาการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและเติมลิวซีนเป็นซัพพลีเมนต์ ในขณะเดียวกัน Kim และคณะก็ได้ศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโคแฟกเตอร์ที่สำคัญที่มีบทบาทต่อวิถีการสังเคราะห์และสะสม PHB ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการเติมลิวซีนเป็นซับพลีเมนต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเมื่อใช้ลิวซีนเป็นซับพลีเมนต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 มีอัตราการสังเคราะห์ PHB เพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มขึ้นของอัตราการสังเคราะห์ PHB นี้เกิดขึ้นเนื่องจาก เมื่อเติมลิวซีนเป็นซัพพลีเมนต์ ทำให้ปริมาณโคเอนไซม์เออิสระลดลง แต่อัตราส่วนของ NAD(P)H ต่อ NAD(P) มีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งปัจจัยนี้จะส่งผลให้ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 มีอัตราการสังเคราะห์ PHB เพิ่มมากขึ้นด้วย ซึ่งสนับสนุนรายงานการวิจัยของ Senior และ Dawes, (1971) และ Oeding และ Schlegel,(1973) ที่ทำการศึกษากลไกการควบคุมการสังเคราะห์และสะสม PHB และพบว่า อัตราการสังเคราะห์ PHB จะถูกกระตุ้นให้เพิ่มมากขึ้นเมื่อระดับปริมาณความเข้มข้นของ NAD(P)H ภายในเซลล์มีค่าสูงขึ้น และอัตราการสังเคราะห์ PHB จะลดลงเมื่อระดับปริมาณของโคแฟกเตอร์ดังกล่าวมีค่าลดลง นอกจากผลงานวิจัยของนักวิจัยทั้ง 3 กลุ่มซึ่งสอดคล้องและมีเหตุผลสนับสนุนกับผลการทดลองของงานวิจัยนี้ ยังได้มีการตั้งข้อสันนิษฐานงานวิจัยของ Ramirez และ Bentley,(1993) ถึงการเติมกรดอะมิโนบางชนิด เช่น เฟนนิลอาลานีนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะกระตุ้นให้เชื้อมีการสังเคราะห์โปรตีนที่มีเฟนนิลอาลานีนเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณมากได้เพิ่มขึ้น

จากผลการทดลองของงานวิจัยนี้ และข้อสันนิษฐานอย่างมีเหตุผลของนักวิจัยหลายกลุ่มตลอดจนการศึกษาค้นคว้าถึงวิถีการสังเคราะห์และสลายกรดอะมิโน ผู้วิจัยจึงตั้งข้อสันนิษฐานอธิบายผลการวิจัยภายใต้หลักการและเหตุผลดังต่อไปนี้

การเติมลิวซีน ไอโซลิวซีน อาร์จินีน และเมทไธโอนีน เป็นซัพพลีเมนต์อาจมีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของโคแฟกเตอร์ที่สำคัญ ที่มีบทบาทควบคุมการสังเคราะห์และสะสม PHB ของ *Alcaligenes sp.* A-04 ได้แก่ โคเอนไซม์เออิสระ และNAD(P)H ซึ่งมีผลกระตุ้นในการส่งเสริมให้ *Alcaligenes sp.* A-04 สังเคราะห์และสะสม PHB ได้เพิ่มขึ้น

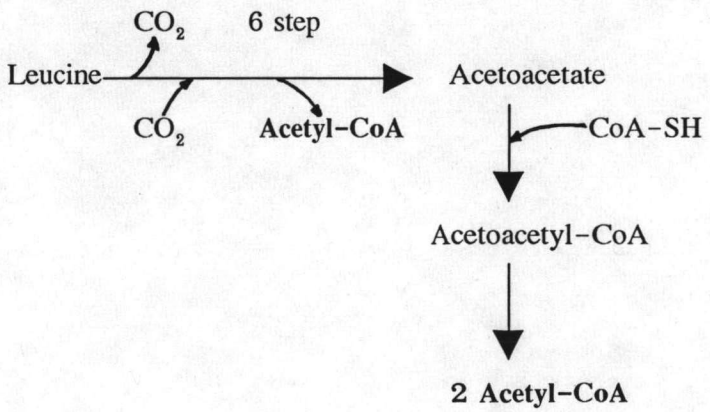
การเติมกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิดลงไปในอาหาร MSM อาจจะส่งผลให้ *Alcaligenes sp.* A-04 สังเคราะห์และสะสม PHB ได้มากขึ้น เนื่องจากกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิดอาจจะเป็นกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบการสังเคราะห์ PHB ก็ได้

เนื่องจากเมทไธโอนีนเป็นกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ตั้งสมมติฐานว่า อาจเป็นผลมาจากคุณสมบัติของการมีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุลของเมทไธโอนีนที่มีผลกระตุ้นให้การสังเคราะห์และสะสมPHB โดย *Alcaligenes sp.* A-04 เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงได้ทำการวิจัยยืนยันโดยการใช้ซีสเตอีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนอีกชนิดหนึ่งที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุลเป็นซัพพลีเมนต์แทนการใช้เมทไธโอนีน (ผลการทดลองที่ 3.3.8)

แต่พบว่า การใช้ซีสเตอีนเป็นซัพพลีเมนต์ส่งผลให้ *Alcaligenes sp.* A-04 สังเคราะห์และสะสม PHB ได้ลดลง ดังนั้นจึงสรุปว่า ผลของเมทไธโอนีนซึ่งกระตุ้นให้ *Alcaligenes sp.* A-04 สังเคราะห์และสะสม PHB ได้เพิ่มขึ้น จึงไม่ใช่เพราะคุณสมบัติของการมีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุลเมทไธโอนีน

การสังเคราะห์เมทไธโอนีนที่เกิดขึ้นภายในเซลล์นั้น จะต้องใช้ NADPH 8 โมเลกุลเป็นโคเอนไซม์ในการสังเคราะห์เมทไธโอนีน 1 โมเลกุล (ในขณะที่กรดอะมิโนชนิดอื่นใช้ NADPH อย่างมากไม่เกิน 5 โมเลกุลต่อการสังเคราะห์ 1 โมเลกุลกรดอะมิโนเหล่านั้น) (Neidhardt และคณะ ,1990) และ NADPH นี้ก็เป็นโคเอนไซม์ในการสังเคราะห์ PHB ดังนั้นการเติมเมทไธโอนีนลงไป จึงอาจทำให้มีปริมาณเมทไธโอนีนในเซลล์เพียงพอไม่จำเป็นต้องสังเคราะห์เมทไธโอนีนเพิ่มขึ้นอีก เป็นผลให้ระดับความเข้มข้น NADPH สูงเพียงพอสำหรับการสังเคราะห์ PHB จึงได้ปริมาณ PHB สูงขึ้น

จากการศึกษาวิถีปฏิกิริยาการคาตาโบไลซ์ของลิวซีนภายในเซลล์ที่อาจมีผลส่งเสริมให้ *Alcaligenes sp.* A-04 สามารถสังเคราะห์และสะสม PHB ได้เพิ่มขึ้นเมื่อเติมลิวซีนเป็นซัพพลีเมนต์ เนื่องจากคาตาโบลิสมของลิวซีน 1 โมเลกุล จะได้อะเซติลโคเอ 3 โมเลกุลเป็นผลิตภัณฑ์ (ดังรูปที่ 40) (Lehninger, 1993) ซึ่งอะเซติลโคเอนี้ เป็นสารตั้งต้นของวิถีการสังเคราะห์ PHB นั่นเอง การเติมลิวซีนเป็นซัพพลีเมนต์เพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes sp.* A-04 จึงอาจเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะรักษาระดับปริมาณอะเซติลโคเอให้มีเพียงพอต่อวิถีการสังเคราะห์ PHB และส่งผลให้การสังเคราะห์และสะสม PHB ใน *Alcaligenes sp.* A-04 เพิ่มสูงขึ้น



รูปที่ 40 คาตาโบลิสมของลิวซีน (Lehninger 1993)

4.3 ผลของกรดโอเลอิกต่อการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes sp.* A-04

จากการแปรผันระดับความเข้มข้นของกรดโอเลอิก ให้มีค่าเท่ากับ 1.0 2.5 5.0 10.0 และ 15.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดโอเลอิกที่มีค่าเท่ากับ 10.0 มิลลิโมลาร์ ทำให้ *Alcaligenes sp.* A-04 มีการสังเคราะห์และสะสม PHB ได้สูงสุดโดยมีค่าประมาณ 78 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งมีค่าสูงกว่าปริมาณ PHB สูงสุดที่ *Alcaligenes sp.* A-04 สังเคราะห์และสะสมได้เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดโอเลอิกเท่ากับ 1.0 2.5 และ 5.0 มิลลิโมลาร์ ซึ่งได้ปริมาณ PHB มีค่าประมาณ 69 71 และ 74 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ แต่มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณ PHB ที่เชื้อสังเคราะห์และสะสมได้เมื่อใช้ระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดโอเลอิกเท่ากับ 15.0 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีค่าประมาณ 77 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่าที่ทุกความเข้มข้นของกรดโอเลอิกที่ใช้ ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ใกล้เคียงกันโดยมีค่าประมาณ 0.9 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบการทดลองที่เติมกรดโอเลอิกกับการทดลองชุดควบคุม พบว่าในการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดโอเลอิก เท่ากับ 10.0 มิลลิโมลาร์ *Alcaligenes sp.* A-04 สามารถสังเคราะห์และสะสม PHB ได้สูงกว่าชุดควบคุม โดยความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของกรดโอเลอิกที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes sp.* A-04 คือที่ระดับความเข้มข้น 10.0 มิลลิโมลาร์

จากผลการวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าการเติมกรดโอเลอิกที่ระดับความเข้มข้น 10.0 มิลลิโมลาร์ ทำให้ *Alcaligenes sp.* A-04 ที่การเจริญคงที่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมแต่ความสามารถในการสังเคราะห์และสะสม PHB มีค่าเพิ่มขึ้น จากรายงานการวิจัยของ Lee และคณะ (1995) ที่ได้รายงานการผลิต PHB โดยใช้รีคอมบิแนนท์ *E. coli* เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้กรดโอเลอิกเป็นซับพลีเมนต์ พบว่า รีคอมบิแนนท์ *E. coli* จะผลิต PHB ได้สูงขึ้น ในขณะที่น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ก็มีค่าเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่ง Lee และคณะได้ตั้งข้อสันนิษฐานอธิบายผลการทดลองว่าการเติมกรดโอเลอิก อาจส่งเสริมให้มีปริมาณอะเซติลโคเอเพียงพอต่อการสังเคราะห์ PHB เนื่องจากการเติมกรดโอเลอิก อาจส่งผลให้อะเซติลโคเอไม่ถูกนำไปใช้ในวิธีการสังเคราะห์กรดไขมัน จึงทำให้อะเซติลโคเอเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ PHB ได้มากขึ้น จากรายงานการวิจัยของ Lee และคณะ (1995) ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาและค้นคว้าถึงวิถีการสังเคราะห์และสลายกรดไขมันที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและได้ตั้งข้อสันนิษฐานเพื่ออธิบายผลการทดลองภายใต้หลักการและเหตุผลดังนี้ ในวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันที่เกิดขึ้นภายในเซลล์นั้นต้องอาศัยอะเซติลโคเอเป็นสารตั้งต้น (Lehninger, 1993) ดังนั้นถ้าเซลล์ต้องสังเคราะห์กรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนในโมเลกุลจำนวนมากก็จะทำให้ปริมาณอะซิเตทภายในเซลล์ถูกใช้ไปมาก ในขณะที่วิถีการสลายกรดไขมัน โดยปฏิกิริยาบีต้าออกซิเดชั่นจะทำให้ปริมาณอะเซติลโคเอ ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น (Voet และ Voet ,1995) ดังนั้นการเติมกรดโอเลอิกลงไปในอาหาร MSM อาจทำให้กรดโอเลอิกถูกนำไปใช้ในรูปของกรดไขมันสายยาวโดยตรงเป็นผลให้

การสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวภายในเซลล์ถูกยับยั้งเนื่องจากเซลล์ได้รับโดยตรงจากอาหารเลี้ยงเชื้อในขณะเดียวกันกรดโอเลอิกก็สามารถถูกคาตาโบไลซ์ได้อะเซติลโคเอเป็นผลให้มีการรักษาระดับปริมาณอะเซติลโคเอและเพิ่มปริมาณอะเซติลโคเอ จึงทำให้ *Alcaligenes sp.* A-04 สามารถสังเคราะห์และสะสม PHB ได้เพิ่มขึ้น

4.4 ผลของกรดอินทรีย์ต่อการสังเคราะห์ PHB โดย *Alcaligenes sp.* A-04

4.4.1 ผลของกรดกลูโคนิกต่อการสังเคราะห์ PHB โดย *Alcaligenes sp.* A-04 จากการแปรผันความเข้มข้นของกรดกลูโคนิกให้มีค่าเท่ากับ 0.25 0.50 0.75 และ 1.00 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของกรดกลูโคนิกมีค่าเท่ากับ 0.75 กรัมต่อลิตร *Alcaligenes sp.* A-04 สามารถสังเคราะห์และสะสม PHB ได้สูงสุดโดยมีค่าเท่ากับ 82 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งสูงกว่าปริมาณ PHB สูงสุดเมื่อใช้กรดกลูโคนิกที่ระดับความเข้มข้น 0.25 0.50 และ 1.00 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้ปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 75 79 และ 79 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ รวมทั้งสูงกว่าปริมาณ PHB สูงสุดของชุดควบคุมซึ่งมีค่าเท่ากับ 68.96 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

จากผลการวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การเติมกรดกลูโคนิกในความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองนี้มีผลให้การสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes sp.* A-04 มีค่าเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม จากการทบทวนเอกสารของงานวิจัยเกี่ยวกับวิถีการสังเคราะห์ PHB โดยจุลินทรีย์ยังไม่พบรายงานการวิจัยที่ใกล้เคียงกับงานวิจัยเรื่องนี้ แต่จากการศึกษาค้นคว้าถึงเมตาโบลิสมของกลูโคเนต พบว่า 6-ฟอสโฟกลูโคเนต (6-phosphogluconate) ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ของวิถีเพนโทสฟอสเฟตเป็นอนุพันธ์ของกลูโคเนต ดังนั้นการเมตาโบไลซ์ของกลูโคเนตจึงมีแนวโน้มที่จะเมตาโบไลซ์ผ่านปฏิกิริยาออกซิเดทีฟของวิถีเพนโทสฟอสเฟต (The oxidative reaction of the pentose phosphate pathway) (Lehninger, 1993) เป็นผลให้มีการสร้าง NADPH ซึ่งเป็นโคเอนไซม์สำคัญในการสังเคราะห์ PHB และอาจส่งผลให้ *Alcaligenes sp.* A-04 สามารถสังเคราะห์และสะสม PHB ได้เพิ่มขึ้นนั่นเอง

4.4.2 ผลของกรดมาโลนิกต่อการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes sp.* A-04

จากผลการวิจัยโดยแปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดมาโลนิกให้มีค่าเท่ากับ 0.25 0.50 0.75 และ 1.00 กรัมต่อลิตร โดยเติมลงไปในอาหาร MSM พบว่า *Alcaligenes sp.* A-04 สังเคราะห์และสะสม PHB ได้ลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้นของกรดมาโลนิกเพิ่มขึ้น และพบว่าที่ทุกความเข้มข้นของกรดมาโลนิกที่ใช้ *Alcaligenes sp.* A-04 มีการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน โดยค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าประมาณ 0.7 กรัมต่อลิตร โดยค่านี้แตกต่างจาก

ชุดควบคุมที่มีค่าประมาณ 0.9 กรัมต่อลิตรเล็กน้อย ดังนั้นกรดมาโลนิกจึงไม่เหมาะสมที่จะใช้กระตุ้นการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes sp.* A-04

เนื่องจากยังไม่มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการใช้กรดมาโลนิกเป็นซัพพลีเมนต์ เพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์และสะสม PHB โดยจุลินทรีย์ ผู้วิจัยจึงได้ศึกษารายงานการวิจัยที่รายงานถึงการใช้กรดอินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลใกล้เคียงกับกรดมาโลนิก คือ กรดซัคซินิก เพื่อใช้เป็นเหตุผลเปรียบเทียบและอธิบายผลการทดลองของงานวิจัยนี้ จากรายงานการวิจัยของ Lee และคณะ (1996) ที่ได้ศึกษาการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes latus* เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าการเติมกรดซัคซินิกลงไปเป็นซัพพลีเมนต์ ทำให้ *Alcaligenes latus* มีการเจริญลดลง โดยค่าน้ำหนักเซลล์แห้งซึ่งลดลงจากชุดควบคุมที่มีค่าสูงสุดประมาณ 5.0 กรัมต่อลิตร ไปเป็น 4.0 กรัมต่อลิตร ในการทดลองที่เติมกรดซัคซินิก เป็นซัพพลีเมนต์ ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของ *Alcaligenes sp.* A-04 ในงานวิจัยนี้ และถ้าพิจารณาถึง ค่าอัตราการเปลี่ยนซับสเตรทไปเป็น PHB (Yp/s) พบว่าในการทดลองที่เติมกรดซัคซินิกอัตราการเปลี่ยนซับสเตรทไปเป็น PHB นี้มีแนวโน้มที่จะลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยของ Kim และคณะ (1996) ที่ได้ศึกษาผลของกรดซัคซินิกต่อการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของ NADPH ในเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 พบว่าการเติมกรดซัคซินิกลงไปเป็นซัพพลีเมนต์ ทำให้ระดับความเข้มข้นของ NADPH มีค่าเท่ากับ 0.79 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งต่ำกว่าการทดลองชุดควบคุมที่ระดับความเข้มข้นของ NADPH มีค่าเท่ากับ 1.33 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากโครงสร้างที่ใกล้เคียงกันของกรดมาโลนิกและกรดซัคซินิก ผู้วิจัยจึงได้ตั้งข้อสันนิษฐานว่าการเติมกรดมาโลนิกลงไปเป็นซัพพลีเมนต์อาจทำให้ปริมาณความเข้มข้นของ NADPH ภายในเซลล์ของ *Alcaligenes sp.-04* ลดลงเช่นเดียวกับการเติมกรดซัคซินิกเป็นผลให้ความสามารถในการสังเคราะห์และสะสม PHB ซึ่งแปรผันตามความเข้มข้นของ NADPH มีค่าลดลงด้วย

4.4.3 ผลของกรดโพรพิโอนิกต่อการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes sp.* A-04

จากผลการวิจัยโดยแปรผันระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดโพรพิโอนิกให้มีค่าเท่ากับ 0.25 0.50 0.75 และ 1.00 กรัมต่อลิตร โดยเติมลงไปในอาหาร MSM พบว่า เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดโพรพิโอนิกเพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณ PHB ที่ *Alcaligenes sp.*A-04 สังเคราะห์และสะสมมีค่าลดลงโดยมีค่าลดลงจากชุดควบคุมที่มีค่าปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 68.96 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นมีค่าประมาณ 64 63 61 และ 55 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในการทดลองที่เติมกรดโพรพิโอนิก 0.25 0.50 0.75 และ 1.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดก็มีค่าเท่ากับ 0.72 0.54 0.44 และ 0.32 กรัมต่อลิตร

ตามลำดับ ซึ่งลดลงจากชุดควบคุมซึ่งมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 0.87 กรัมต่อลิตร จากผลการวิจัยดังกล่าวแสดงว่าการเติมกรดโพรพิโอนิกที่แปรผันความเข้มข้นลงไปในอาหาร MSM ทำให้ *Alcaligenes sp.* A-04 มีการเจริญเติบโตลดลง รวมทั้งปริมาณ PHB ที่ได้ก็ต่ำลงด้วย จากรายงานการวิจัยของ Lee และคณะ (1995) ที่รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* R-510 ในอาหารที่มีกลูโคสและเติมกรดโพรพิโอนิก โดยแปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 ถึง 2.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่า การเจริญเติบโตของ *Bacillus thuringiensis* R-510 ลดลงตามความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกที่เพิ่มขึ้น และเมื่อความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกมีค่าเท่ากับ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เชื้อไม่มีการเจริญเติบโต ซึ่งผลการวิจัยของ Lee และคณะ (1995) สอดคล้องกับผลการทดลองของงานวิจัยนี้ ดังนั้นจากงานวิจัยนี้อาจสันนิษฐานได้ว่า *Alcaligenes sp.* A-04 มีการเจริญเติบโตและสังเคราะห์ PHB ได้ลดลง ตามความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกที่เพิ่มขึ้นอาจเกิดเนื่องจากความเป็นพิษของกรดต่อเซลล์

4.4.4 ผลของกรดบิวทีริกต่อการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes sp. A-04*

จากผลการวิจัยโดยแปรผันระดับความเข้มข้นของกรดบิวทีริกให้มีค่าเท่ากับ 0.25 0.50 0.75 และ 1.00 กรัมต่อลิตร โดยเติมลงไปในอาหาร MSM พบว่าเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดบิวทีริกเพิ่มขึ้น ทำให้ *Alcaligenes sp.* A-04 มีการเจริญเติบโตลดลง ซึ่งเห็นได้จากน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ลดลงจากการทดลองชุดควบคุมที่มีค่าเท่ากับ 0.87 กรัมต่อลิตรไปเป็น 0.75 0.65 0.44 และ 0.36 กรัมต่อลิตร ในการทดลองที่แปรผันความเข้มข้นของกรดบิวทีริกให้มีค่าเท่ากับ 0.25 0.50 0.75 และ 1.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ในขณะที่ความสามารถในการสังเคราะห์และสะสม PHB มีค่าเท่ากับ 68 66 66 และ 65 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ ซึ่งพบว่าเมื่อความเข้มข้นของกรดบิวทีริกเพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณ PHB ลดลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ PHB ของการทดลองชุดควบคุมที่มีค่าเท่ากับ 68.96 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่าการเติมกรดบิวทีริกที่แปรผันความเข้มข้นลงไปในอาหาร MSM จะทำให้ *Alcaligenes sp.* A-04 มีการเจริญเติบโตลดลงอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่ความสามารถในการสังเคราะห์และสะสม PHB ลดลงเล็กน้อยตามความเข้มข้นของกรดบิวทีริกที่เพิ่มขึ้น จากงานวิจัยของ Page และคณะ (1997) ที่รายงานว่า *Azotobacter salinestris* มีการเจริญเติบโตและสังเคราะห์ P (3HB-CO-3HV) ได้ลดลงเมื่อใช้กรดบิวทีริก กรดโพรพิโอนิก และกรดวาเลอริก เป็นแหล่งคาร์บอนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นอาจสันนิษฐานได้ว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ลดลงตามความเข้มข้นของกรดบิวทีริกที่เพิ่มขึ้นอาจเกิดจากความเป็นพิษของกรดต่อเซลล์ของ *Alcaligenes sp.* A-04 และอาจส่งผลให้ปริมาณ PHB ที่เชื้อสังเคราะห์และสะสมมีค่าลดลงด้วย