หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 รูปแบบการเจริญและการผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ในอาหารสูตรเกลือแร่

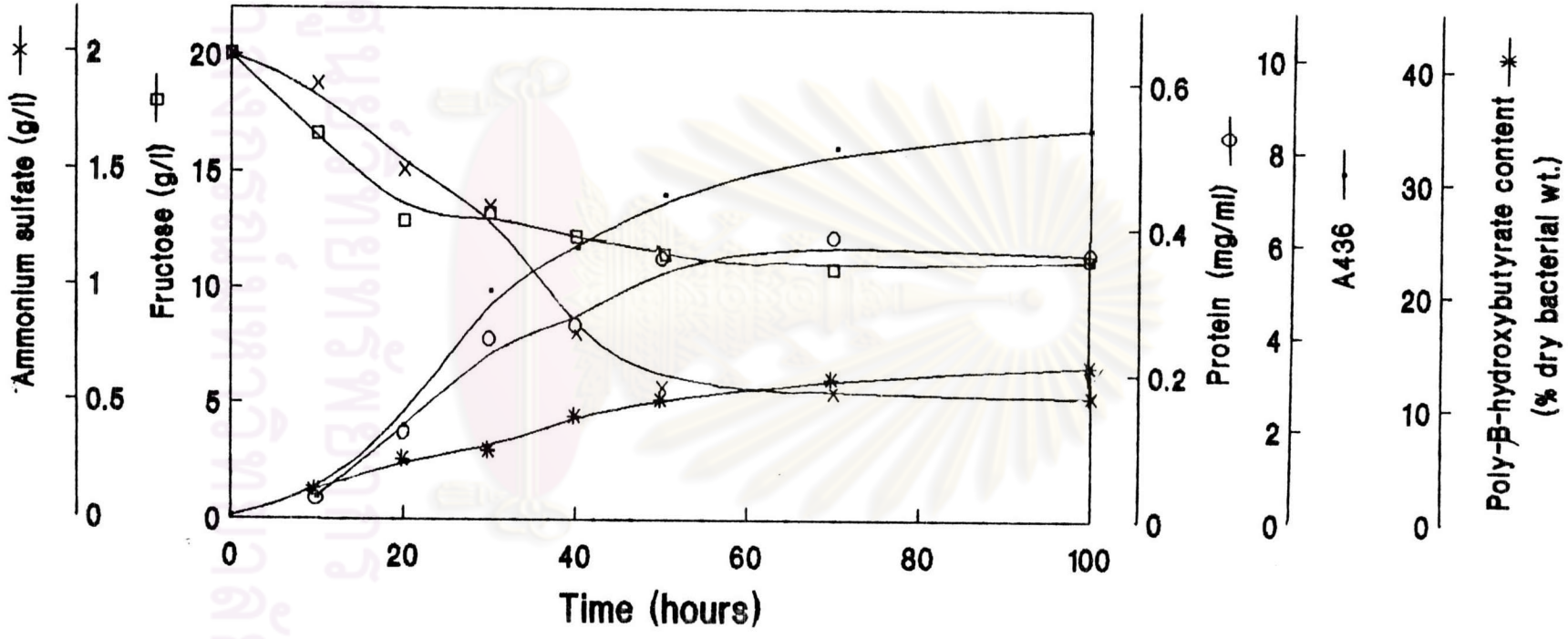
เพาะเลี้ยงเซลล์ *A.eutrophus* ATCC 17697 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วย ฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °ซ (วิธีข้อ 2.6.2) เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นแล้วถ่ายสู่อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิมทำการเพาะเลี้ยง (วิธีข้อ 2.6.3) โดยใช้สภาวะเดียวกับที่เพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นติดตามการเจริญและผลิต PHB (วิธีข้อ 2.6.4 และ 2.7.1) วัดปริมาณของฟรุกโตสและแอมโมเนียมซัลเฟต (วิธีข้อ 2.8.1 และ 2.9)

ผลการทดลอง (รูปที่ 4) แสดงให้เห็นว่า *A.eutrophus* ATCC 17697 เจริญเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุด ซึ่งมีค่าการเจริญคงที่ (stationary phase) ที่เวลา 70 ชั่วโมง ($A_{436} \tilde{=} 8.1\text{-}8.6$) รูปแบบของการเจริญซึ่งสังเกตจากความเข้มข้นโปรตีนของเซลล์คล้ายคลึงกับค่าความขุ่นตลอดช่วงของการเจริญ และที่เวลา 50 ชั่วโมงจะมีปริมาณโปรตีนสูงสุดและคงที่ ส่วนรูปแบบของการสังเคราะห์ PHB จะสัมพันธ์กับการเจริญ โดยจะเพิ่มขึ้นตามเวลาของการเพาะเลี้ยงจนกระทั่งเวลาที่มีค่าการเจริญสูงสุดจะให้ปริมาณ PHB สูงสุดและคงที่ประมาณ 13 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง

สำหรับปริมาณฟรุกโตสและแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่า จะลดลงในช่วง 50 ชั่วโมงแรกของการเจริญ และเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญคงที่แล้วจะมีการใช้แหล่งต้นตอคาร์บอนและไนโตรเจนน้อยมาก

3.2 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต PHB

ทำการเพาะเลี้ยง *A.eutrophus* ATCC 17697 ใน NB เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้นแล้วถ่ายสู่อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเกลือแร่ ที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน คือ เมธานอล, เอธานอล, กรดอะซิติค, กลูโคส, ฟรุกโตส และ ซูโครส ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตรในสภาวะเดียวกันกับที่ใช้ในข้อ 3.1 เป็นเวลา 50 ชั่วโมง ผลการทดลอง (ตารางที่ 4) จะเห็นว่าฟรุกโตสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนที่ดีที่สุดทั้งเพื่อการเจริญและการผลิต PHB และเซลล์สามารถใช้กลูโคสในการ



รูปที่ 4 แสดงรูปแบบการเจริญและการผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 สัมพันธ์กับปริมาณฟรุกโตสและแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที

ตารางที่ 4 การเจริญและผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ที่เวลา 50 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร โดยใช้แหล่งต้นตอคาร์บอนชนิดต่าง ๆ (ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร)

แหล่งคาร์บอน	A_{436}	% PHB (w/w)
methanol	0.115	0.33
ethanol	0.087	0.25
acetic acid	0.048	0.09
glucose	0.247	0.30
fructose	7.800	15.00
sucrose	0.138	0.12

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เจริญได้บ้างเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ ในช่วงระยะเวลาและสภาวะของการเพาะเลี้ยงเดียวกัน

3.3 ผลของปริมาณแหล่งต้นตอคาร์บอน (carbon source) ต่อการเจริญและการผลิต PHB

เจริญเชื้อ *A.eutrophus* ATCC 17697 ในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรและแปรผันปริมาณฟรุกโตสเป็น 20 และ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้ NB เป็นเชื้อตั้งต้น ในสภาวะเดียวกันกับที่ใช้ในข้อ 3.1

ผลการทดลอง (รูปที่ 5) พบว่าเซลล์ *A.eutrophus* สามารถเจริญในอาหารที่ประกอบด้วย ฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตรได้ดีที่สุด มีการเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดในเวลารวดเร็ว (ที่เวลาประมาณ 40 ชั่วโมง) และสามารถสังเคราะห์โปรตีนได้สูงตลอดช่วงการเจริญเมื่อเทียบกับในอาหารที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 40 กรัมต่อลิตร (ประมาณ 2 เท่า) และเมื่อพิจารณาการสังเคราะห์ PHB ในช่วงการผลิต (production phase) หลังจากการสังเคราะห์โปรตีนสิ้นสุดลง (ปริมาณโปรตีนคงที่) ก็พบว่าในอาหารที่มีฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร จะมีการสังเคราะห์ PHB ประมาณ 16 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักแห้ง เช่นเดียวกับความเข้มข้นฟรุกโตส 40 กรัมต่อลิตร แบคทีเรียก็สามารถสังเคราะห์ PHB ได้ใกล้เคียงกัน (14-15 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักแห้ง) แม้ว่าการสังเคราะห์ PHB สูงสุดในอาหารที่มีฟรุกโตส 20 และ 40 กรัมต่อลิตรจะมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ช่วงเวลาผลิต PHB ได้สูงสุดในอาหารที่มีฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตรจะสั้นกว่าประมาณ 2 เท่า ส่วนปริมาณฟรุกโตสจะลดลงในระยะแรกอย่างรวดเร็วแล้วอัตราการใช้จะลดลงจนเกือบคงที่ในระยะที่มีการสังเคราะห์ PHB สูงสุด ในขณะที่แอมโมเนียมซัลเฟตจะมีปริมาณลดลงในลักษณะที่สัมพันธ์กับการสังเคราะห์โปรตีน

3.4 รูปแบบการเจริญและการผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ในอาหารสูตรเกลือแร่เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เพาะเลี้ยงเซลล์ *A.eutrophus* ATCC 17697 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเกลือแร่ประกอบด้วยกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร ในสภาวะเดียวกันกับที่ใช้ในข้อ 3.1

ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 6 พบว่าในช่วงระยะต้นเซลล์มีการเจริญ (A_{436} และปริมาณโปรตีนสุทธิภายในเซลล์) เพียงเล็กน้อยและคงที่ในช่วง 80 ชั่วโมงแรก ลักษณะของเซลล์จะมีการเกาะกลุ่มเป็นก้อน (clump), เมือก หลังจากนั้นเซลล์จึงเริ่มมีการเจริญได้ดีขึ้น โดยค่าความขุ่นเพิ่มขึ้น และให้ค่าการเจริญสูงสุดที่เวลา 150 ชั่วโมง (A_{436}~5.9) ส่วนปริมาณโปรตีน

รูปที่ 5 แสดงรูปแบบการเจริญและการผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 สัมพันธ์กับปริมาณฟรุกโตสและแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กับ 40 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที

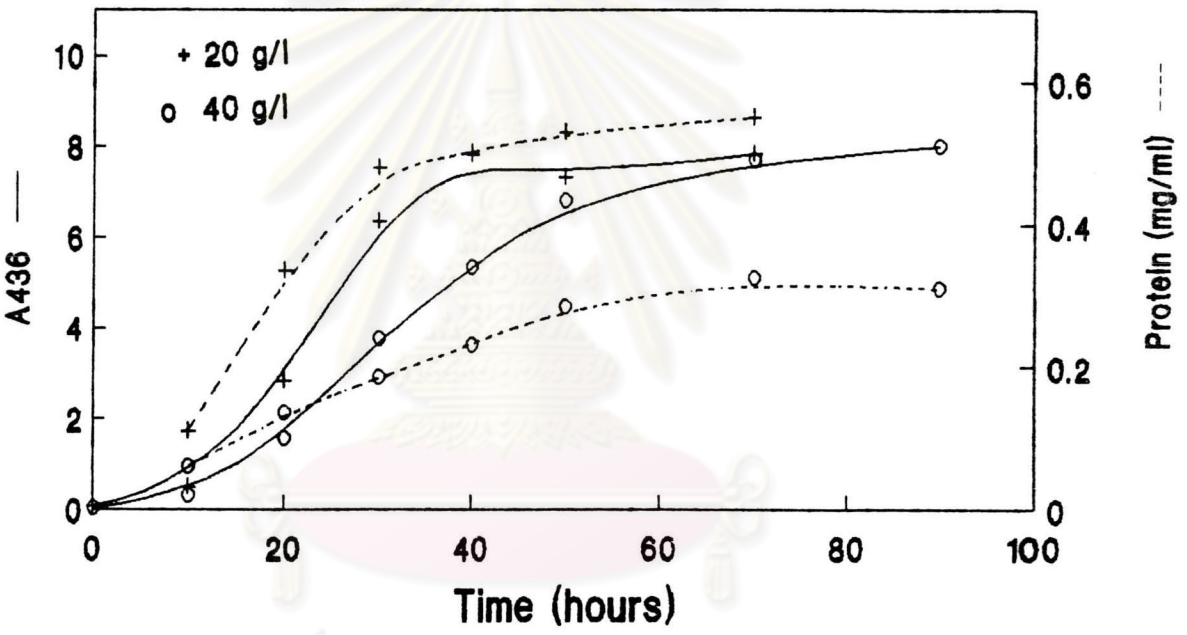
ก. ค่าความขุ่นและปริมาณโปรตีนของเซลล์

ข. ปริมาณ PHB

ค. ปริมาณฟรุกโตสและแอมโมเนียมซัลเฟต

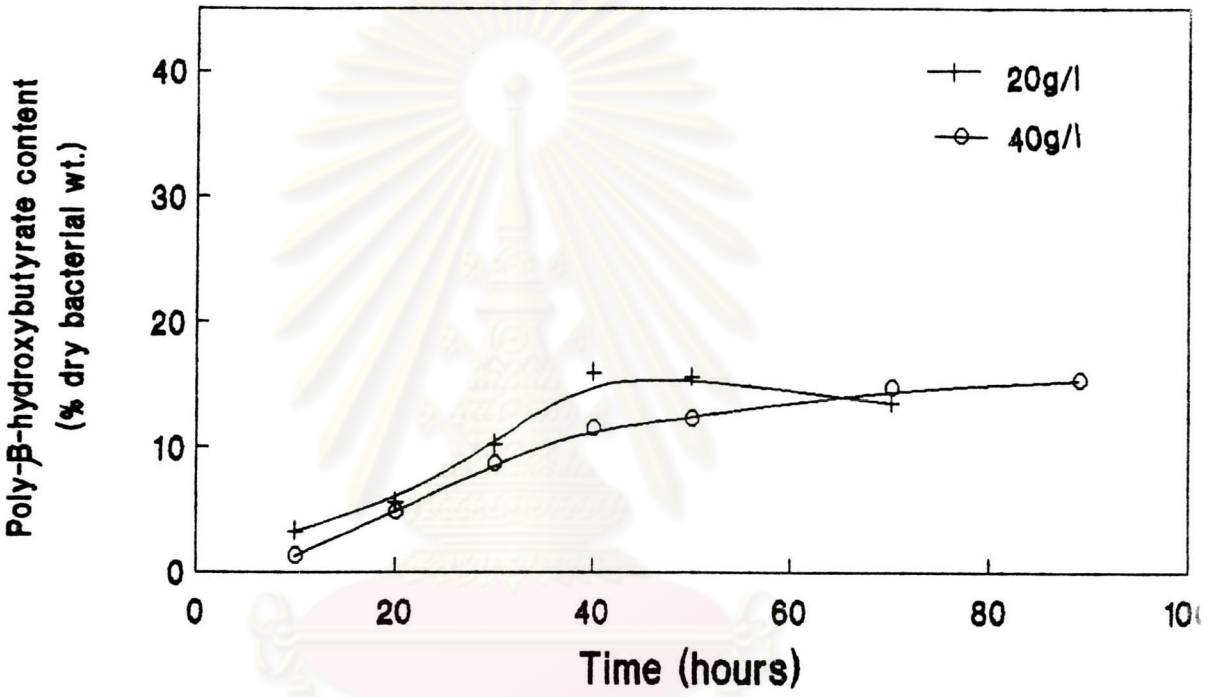
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5ก.



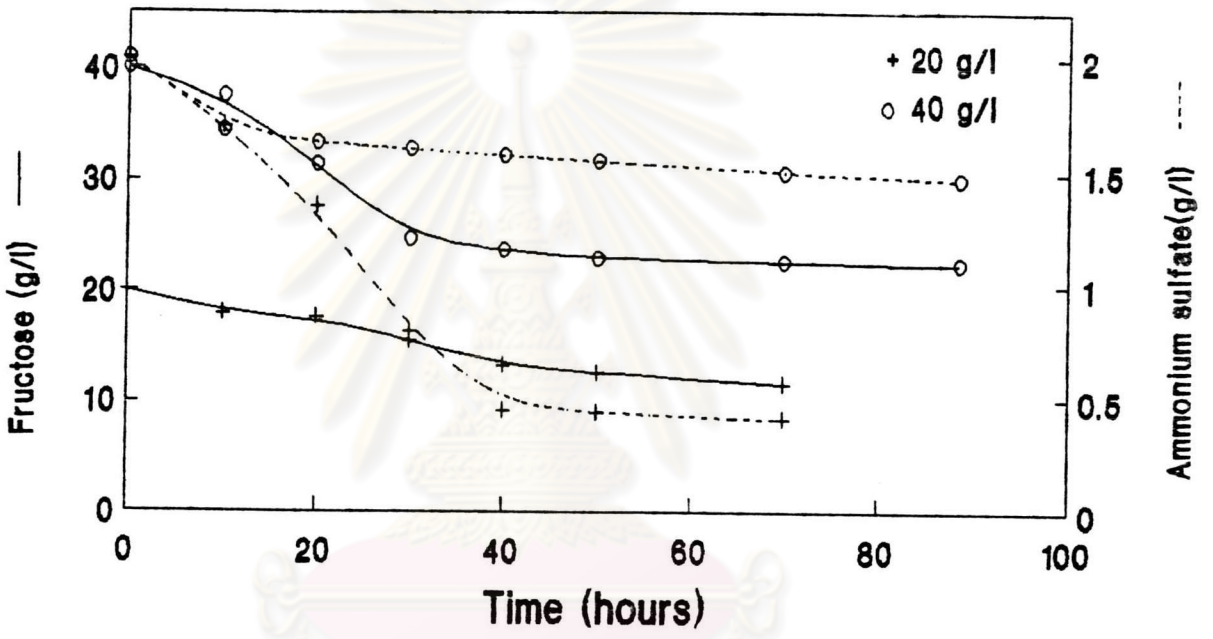
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5ข.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5ค.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จะเริ่มมีการสังเคราะห์เพิ่มขึ้นที่เวลาประมาณ 100 ชั่วโมง และจะมีค่าเพิ่มขึ้น ส่วนการสังเคราะห์ PHB จะเกิดขึ้นในระยะที่เซลล์เริ่มมีการเจริญ ได้ปริมาณ PHB สูงสุด (ชั่วโมงที่ 110-120) คิดเป็นประมาณ 16.5 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งหลังจากนั้นความสามารถของการสังเคราะห์ PHB จะลดลงอย่างรวดเร็วในระยะที่เซลล์มีการเจริญและสังเคราะห์โปรตีนเพิ่มขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญกับเมื่อใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนจะพบว่ามีค่าต่ำกว่าเกือบ 2 เท่า และช่วงระยะเวลาของการเจริญสูงสุดยาวกว่าประมาณ 3 เท่า (150 ชั่วโมง) ในขณะที่การผลิต PHB ต่อน้ำหนักแห้งมีค่าใกล้เคียงกันแต่ต้องใช้เวลาประมาณ 110 ชั่วโมง จึงผลิตได้สูงสุดเมื่อเทียบกับฟรุกโตสซึ่งใช้เวลาเพียง 70 ชั่วโมง

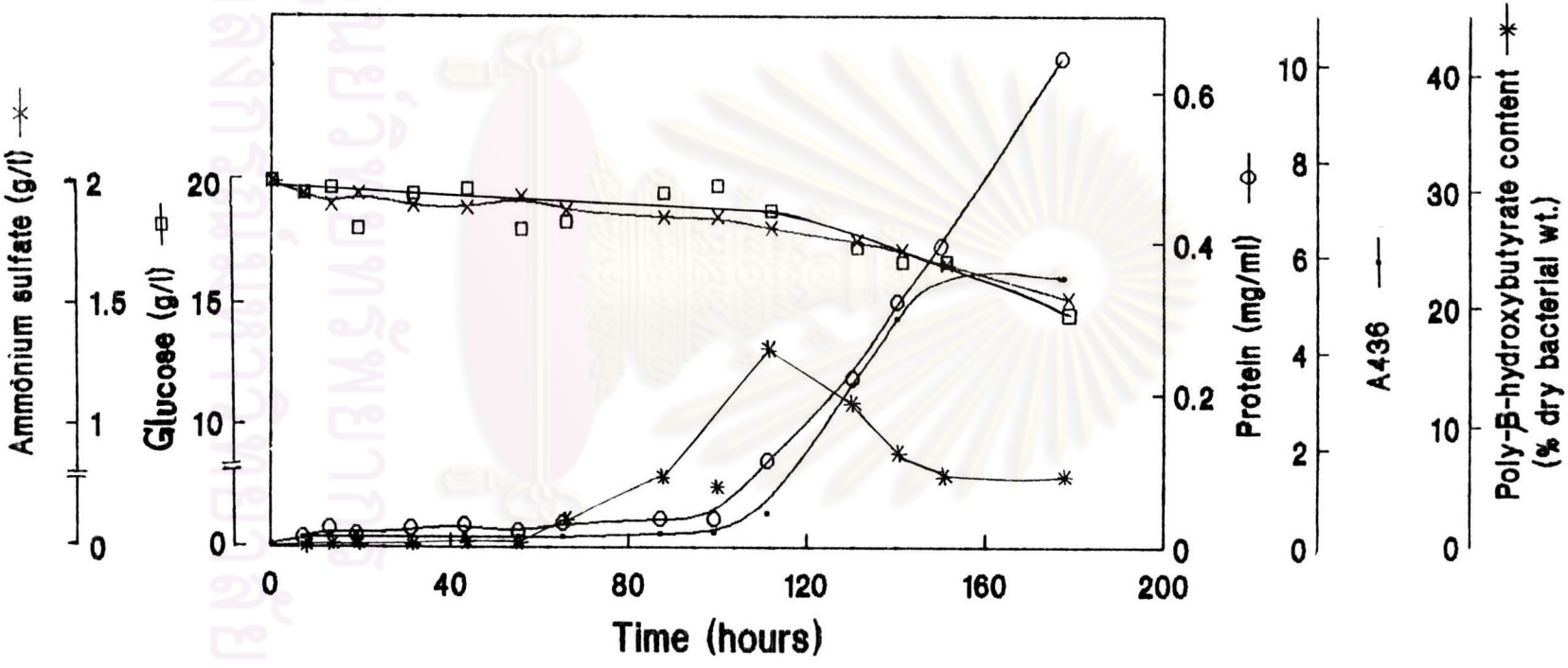
เมื่อพิจารณาปริมาณกลูโคสพบว่าถูกใช้ไปในปริมาณเพียงเล็กน้อยในช่วง 70 ชั่วโมงแรกของการเจริญและจะลดลงในระยะที่เซลล์เริ่มมีการเจริญและสังเคราะห์ PHB อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าระดับกลูโคสที่ถูกใช้ไปในปฏิกิริยานี้เพียงประมาณ 20 เปอร์เซนต์เช่นเดียวกับปริมาณของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ถูกใช้ไปในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ก็เพียง 20 เปอร์เซนต์เช่นกัน

3.5 การศึกษาความต้องการอากาศของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ในการเจริญและผลิต PHB

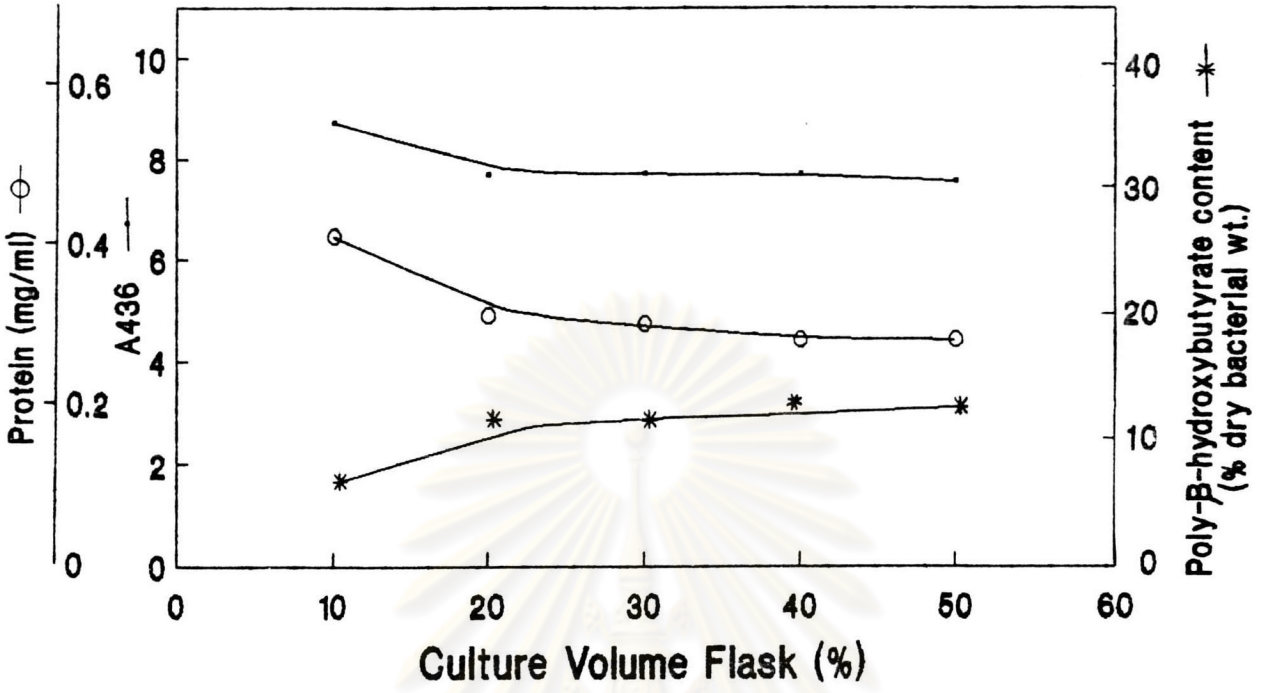
เพาะเลี้ยง *A.eutrophus* ATCC 17697 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรเพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้นแล้วถ่ายสู่อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิมโดยแปรเปลี่ยนปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดรูปชมพู่เป็น 10, 20, 30, 40 และ 50 เปอร์เซนต์ เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °ซ เก็บเซลล์แขวนลอยที่เวลา 50 ชั่วโมง

จากรูปที่ 7 พบว่า ที่ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวด (culture volume flask : CVF) 10 เปอร์เซนต์ มีค่าการเจริญสูงสุด แต่ระดับการสังเคราะห์ PHB ค่อนข้างต่ำเพียง 6.9 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง เมื่อเพิ่มปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 20 เปอร์เซนต์อัตราการเจริญจะลดลงแต่ระดับการสังเคราะห์ PHB จะเพิ่มขึ้นเป็น 11.6 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง และเมื่อเพิ่ม CVF เป็น 30, 40 และ 50 เปอร์เซนต์ จะไม่พบความแตกต่างของการเจริญและการผลิต PHB เมื่อเทียบกับ CVF 20 เปอร์เซนต์ จึงสรุปได้ว่าระดับความต้องการอากาศ ซึ่งแสดงได้ด้วยค่า CVF ที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยง A.eutrophus ATCC 17697 ในระดับขวดเขย่าเพื่อให้การสังเคราะห์ PHB ได้สูงคือ 20 เปอร์เซนต์

i 14838357



รูปที่ 6 แสดงรูปแบบการเจริญ และการผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 สัมพันธ์กับปริมาณกลูโคสและแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที



รูปที่ 7 ผลการศึกษาปัจจัยของการให้อากาศ โดยใช้ค่าปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดต่อการเจริญและการผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 50 ชั่วโมงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรที่อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาทีในเครื่องเขย่าของบริษัท Heto model 02-PT-623

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6 ผลของปริมาณแหล่งต้นตอไนโตรเจน (nitrogen source) ต่อการเจริญ และการผลิต PHB

เพาะเลี้ยง *A.eutrophus* ATCC 17697 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนแล้วแปรผันแหล่งต้นตอไนโตรเจนโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณตั้งแต่ 0 ถึง 1 กรัมต่อลิตร โดยใช้ NB เป็นเชื้อตั้งต้นในสภาวะเดียวกันกับที่ใช้ในข้อ 3.1

ผลการทดลอง (รูปที่ 8) แสดงให้เห็นว่าการเจริญซึ่งวัดด้วยค่าความขุ่นและการสังเคราะห์โปรตีนจะมีรูปแบบเดียวกันโดยระดับแอมโมเนียมซัลเฟตยิ่งสูงจะยิ่งทำให้เซลล์เจริญได้ดีขึ้นโดยเฉพาะการเจริญเมื่อมีเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตรจะสูงสุด (A_{436}~8-9) และสามารถสังเคราะห์โปรตีนได้สูงสุดในช่วงระยะเวลาประมาณ 70 ชั่วโมง (ประมาณ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และเมื่อเปรียบเทียบการสังเคราะห์ PHB จะพบว่ามีค่าใกล้เคียงกันคือมีการสังเคราะห์สูงสุด ชั่วโมงที่ 40-50 โดยระดับการสังเคราะห์ประมาณ 30 และ 35 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 และ 0.5 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และที่ความเข้มข้นของเกลือไนโตรเจนสูงขึ้นไปเป็น 1 กรัมต่อลิตร หรือขาดแหล่งไนโตรเจน การผลิต PHB จะลดลงอย่างชัดเจน (ประมาณ 13 และ 6 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ)

3.7 การเจริญและการผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ในอาหารสูตรอุดม (NB)

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ *A.eutrophus* ATCC 17697 ตั้งต้นในอาหารสูตรอุดมแล้วถ่ายสู่อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิมในสภาวะเดียวกันกับที่ใช้ในข้อ 3.1

ผลการทดลอง (รูปที่ 9) แสดงให้เห็นว่า *A.eutrophus* ATCC 17697 สามารถเจริญในอาหารสูตรอุดมได้ดีและเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุด (A_{436}) ภายในเวลาอันรวดเร็ว (9 ชั่วโมง) แล้วจะคงที่แต่เซลล์ยังคงมีการสังเคราะห์โปรตีนเพิ่มขึ้นและได้ปริมาณโปรตีนสูงสุดในชั่วโมงที่ 18 อย่างไรก็ตามค่าการเจริญ (A_{436} ~ 2.3) และปริมาณโปรตีน (0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สูงสุดของเซลล์ในอาหารสูตรอุดม จะมีค่าต่ำกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ และเมื่อวิเคราะห์ลักษณะการสังเคราะห์ PHB จะเห็นได้ว่า *A.eutrophus* มีการสังเคราะห์ PHB ต่ำมากโดยจะให้ค่าเปอร์เซนต์ PHB เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากการเพาะเลี้ยงเริ่มต้น (ประมาณ 0.4 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง) ในชั่วโมงที่ 3 เมื่อเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญทวีคูณ (early log phase) หลังจากนั้นการสะสม PHB จะลดลงอย่างรวดเร็วและใน ระยะที่เซลล์มีการเจริญถึงช่วงปลายของการเจริญทวีคูณ (late log phase) การสังเคราะห์ PHB จะเหลือเพียง 0.1 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งและการสังเคราะห์ PHB เกือบจะสิ้นสุดโดย

รูปที่ 8 แสดงรูปแบบการเจริญและการผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 สัมพันธ์กับปริมาณฟรุกโตสและแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 0 ถึง 1.0 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที

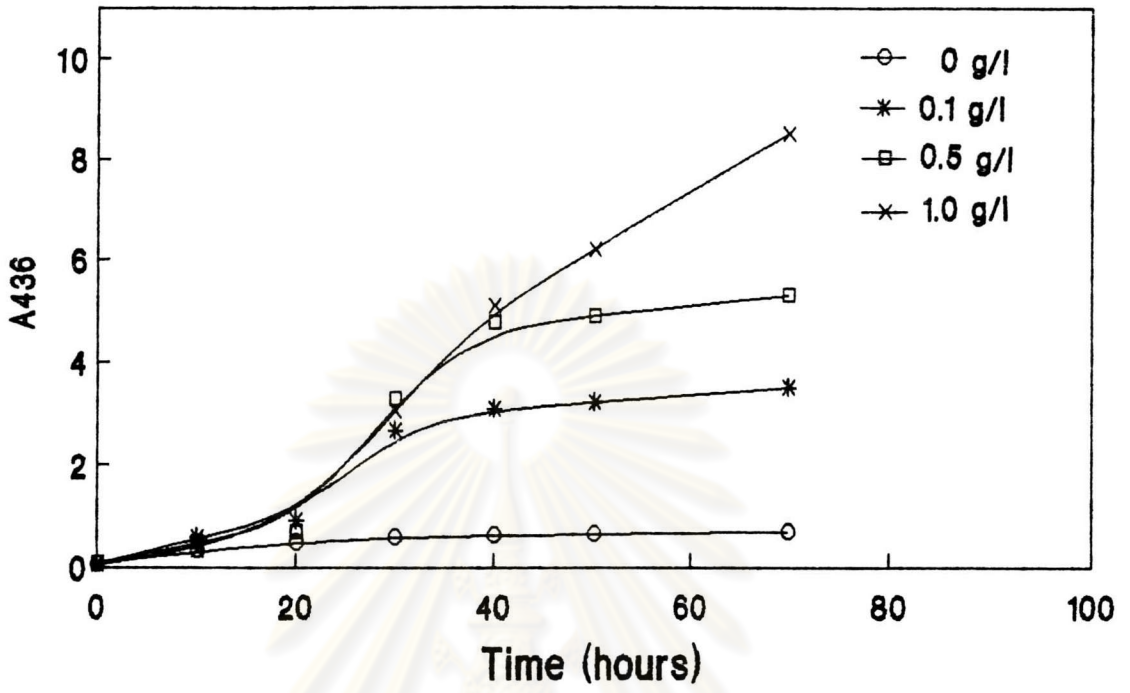
ก. ค่าความขุ่น ข. ปริมาณโปรตีนของเซลล์

ค. ปริมาณ PHB ง. ปริมาณฟรุกโตส

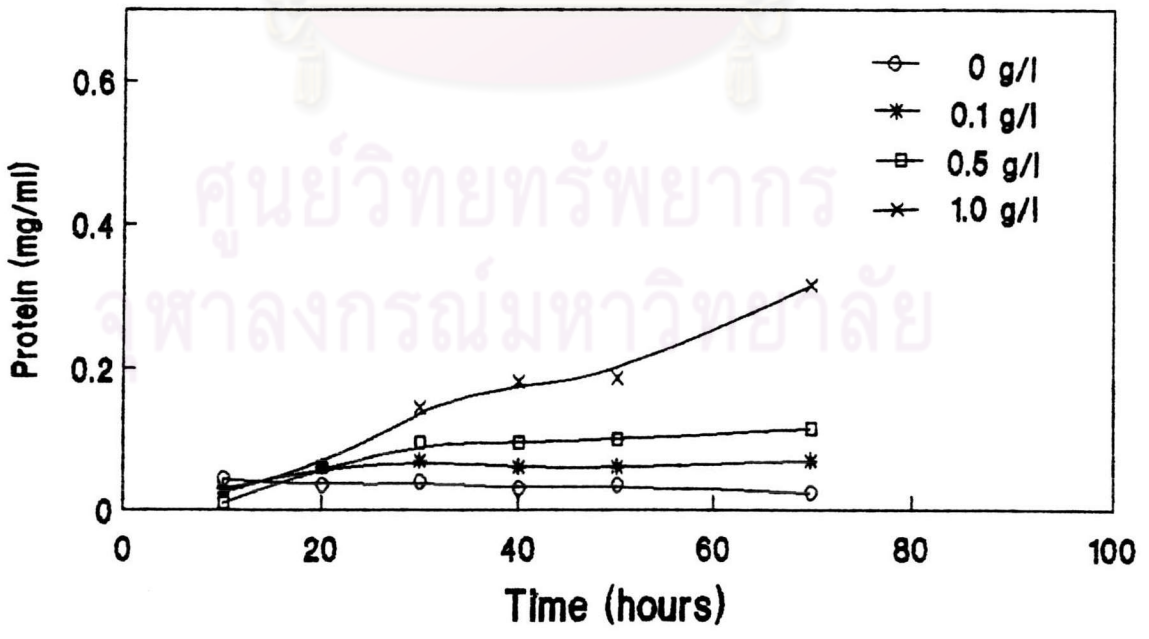
จ. ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8ก.

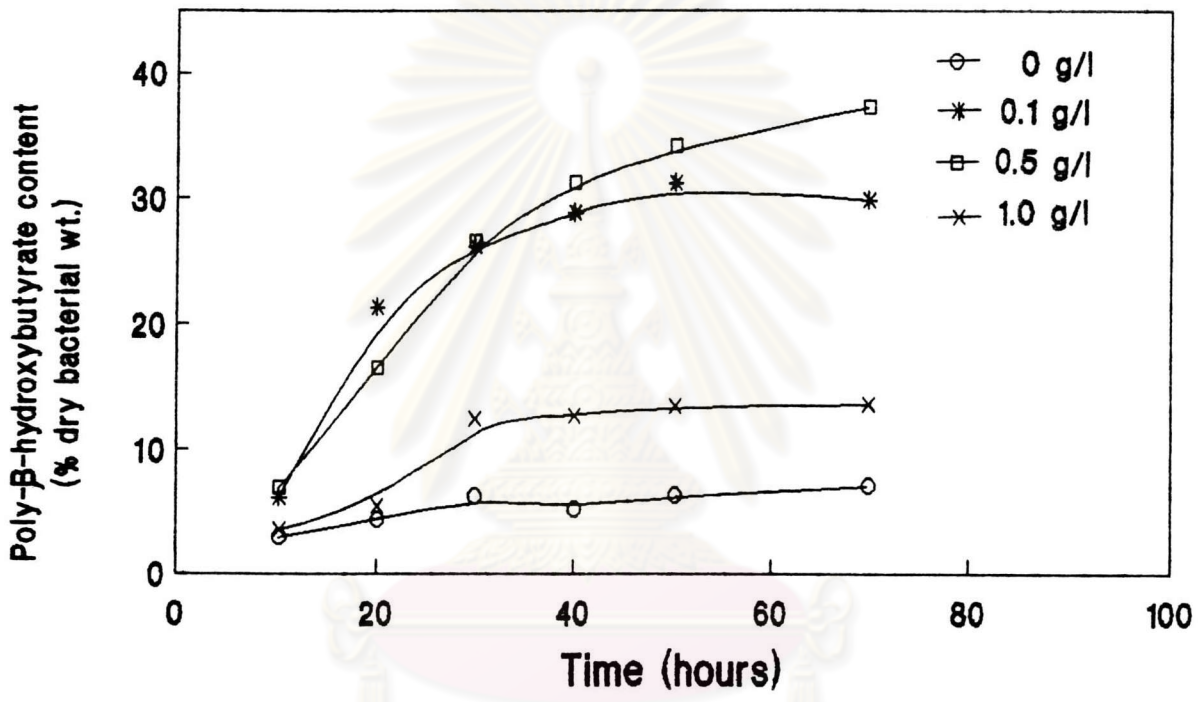


รูปที่ 8ข.



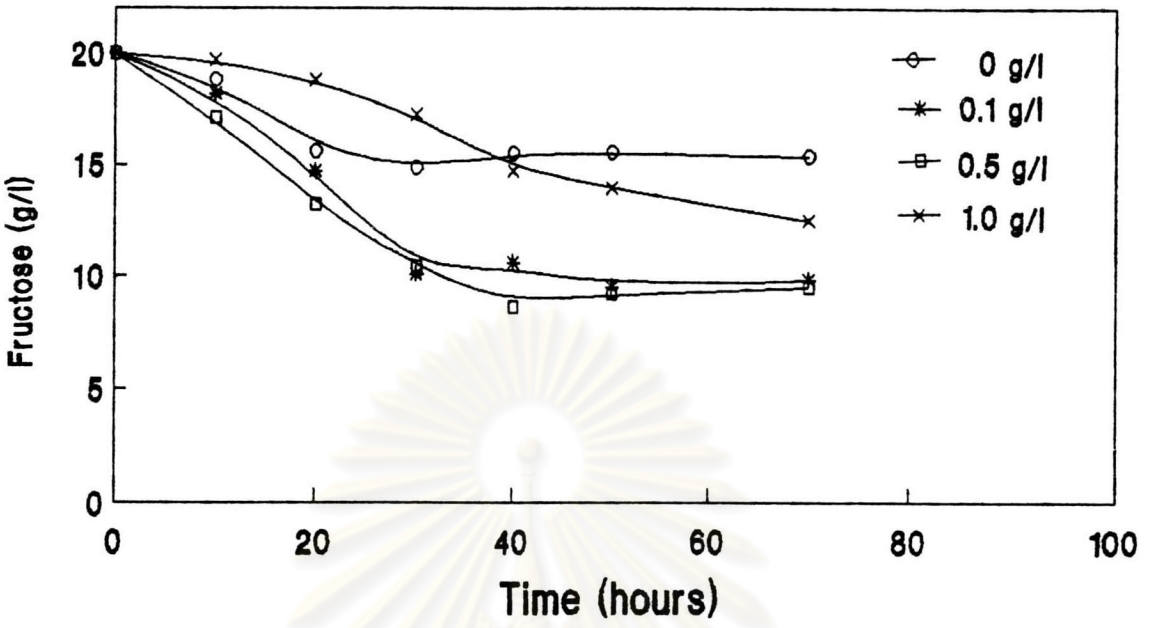
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8ค.

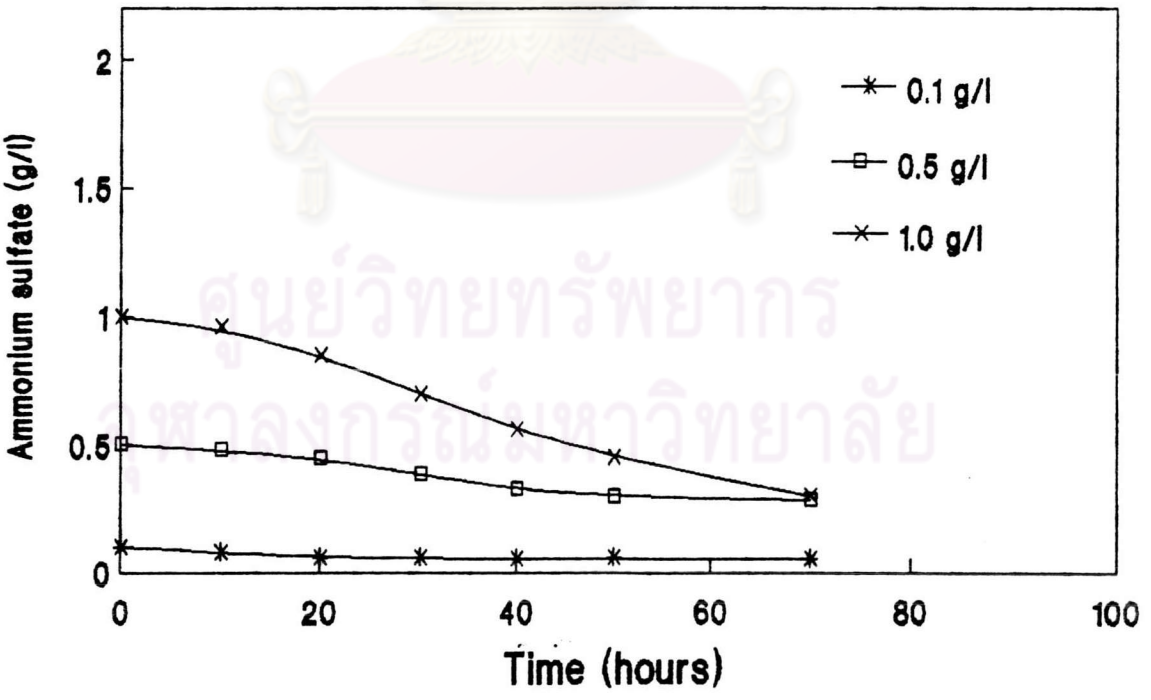


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

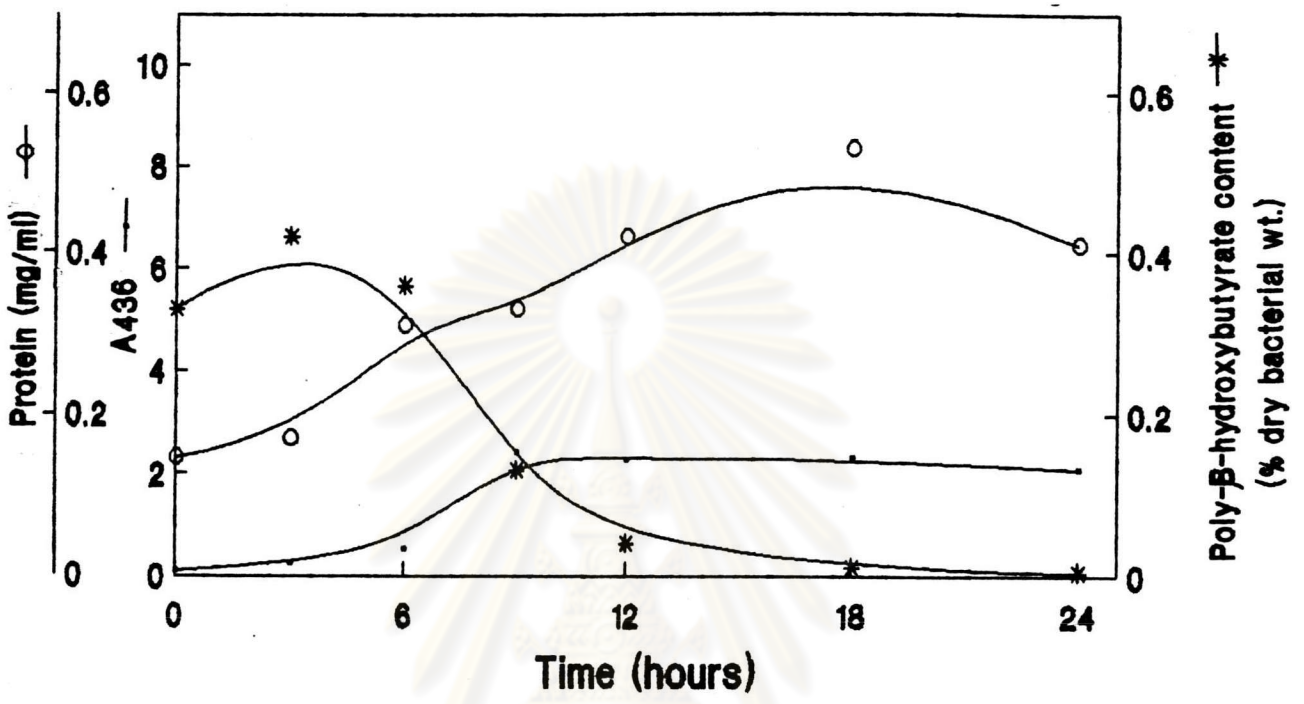
รูปที่ 8ช.



รูปที่ 8ฉ.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 ลักษณะการเจริญและการผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรอุดมที่ประกอบด้วย NB 0.8 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สมบูรณ์เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) โดยเฉพาะช่วงที่มีการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์สูงสุด (18 ชั่วโมง) จะพบ PHB ภายในเซลล์น้อยมาก (~ 0.01 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง)

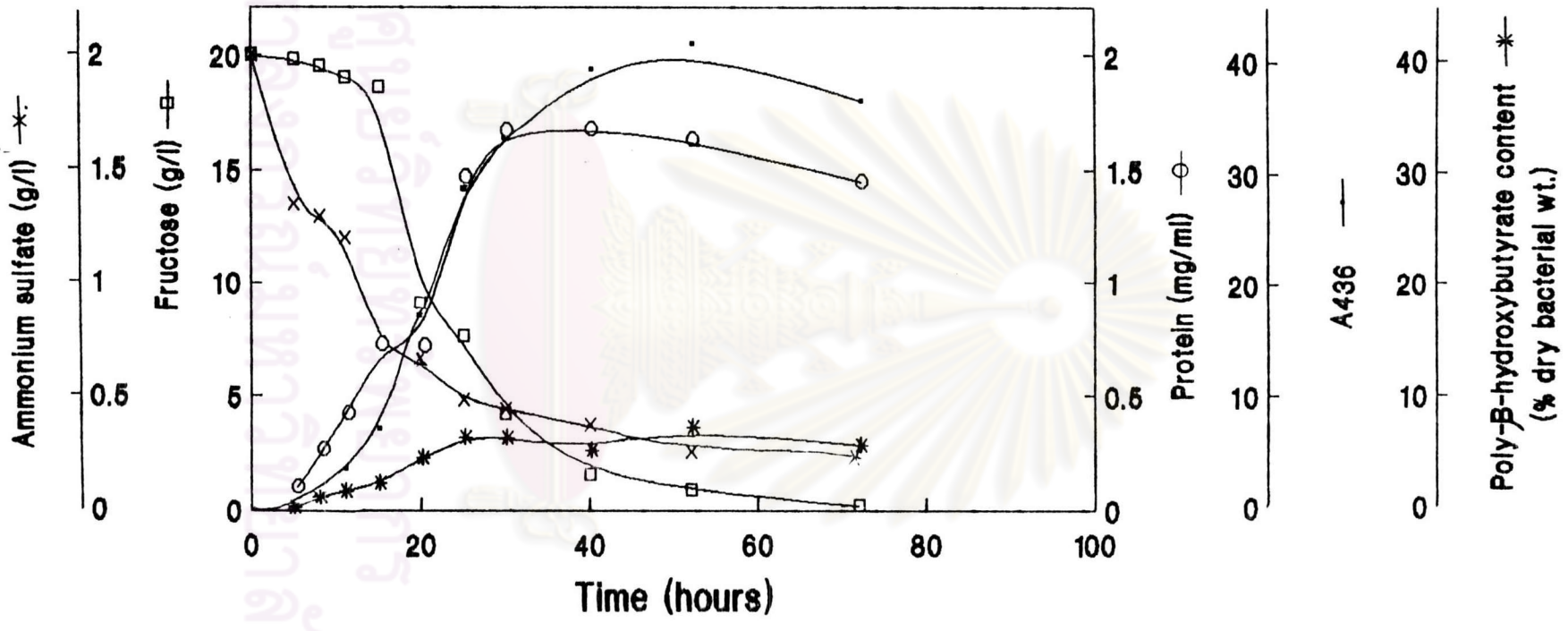
3.8 รูปแบบการเจริญและการผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ในอาหารสูตรเกลือแร่ที่เสริมด้วยอาหารสูตรอุดม (nutrient broth)

ทำการทดลองเพาะเลี้ยง *A.eutrophus* ตั้งต้นในอาหารสูตรอุดมแล้วถ่ายสู่อาหารสูตรเกลือแร่ ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร, แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรเสริมด้วย nutrient broth 0.8 เปอร์เซนต์ ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกันกับข้อ 3.1 แล้วติดตามการเจริญและผลิต PHB

ผลการทดลอง (รูปที่ 10) พบว่า เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารสูตรเกลือแร่ที่เสริมด้วย nutrient broth เซลล์จะมีการใช้อาหารอุดมเพื่อการเจริญอย่างรวดเร็ว ค่าการเจริญซึ่งติดตามด้วยความขุ่นและปริมาณโปรตีนในระยะการเจริญสูงสุดจะเพิ่มขึ้นจากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่อย่างเดียวประมาณ 5-6 เท่า และ 3 เท่าตามลำดับ และมีการเจริญสูงสุดที่เวลา 50 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญจึงลดลงเล็กน้อยเช่นเดียวกับรูปแบบของการสังเคราะห์โปรตีนซึ่งจะสังเคราะห์โปรตีนสูงสุดประมาณชั่วโมงที่ 30 เท่านั้นแล้วจะลดลงเล็กน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 70 เช่นกัน

เมื่อติดตามรูปแบบและลักษณะการสังเคราะห์ PHB ในช่วง 25 ชั่วโมงแรกของการเจริญพบว่าปริมาณจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง สามารถสังเคราะห์ PHB ได้สูงสุดที่เวลา 30 ชั่วโมง แต่ระดับของ PHB ที่สังเคราะห์ต่ำมากประมาณ 6.8 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งเท่านั้นสอดคล้องกับการสังเคราะห์โปรตีนเช่นกัน หลังจากนั้นการสังเคราะห์ PHB จะมีค่าคงที่โดยไม่มีการลดลงเหมือนการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรอุดม (NB) เดี่ยว ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรเกลือแร่ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้สูงสุดจะมีค่าต่ำกว่าเกือบ 2.5 เท่า

พิจารณาปริมาณฟรุกโตส ในช่วง 15 ชั่วโมงแรกของการเจริญเกือบไม่มีการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดนี้เลย หลังจากนั้นฟรุกโตสจะถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว (ปริมาณจะลดลง 2 เท่าในชั่วโมงที่ 20) ซึ่งสัมพันธ์กับความขุ่นที่มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นกัน และในช่วงท้ายของการเจริญจะพบฟรุกโตสเหลืออยู่น้อยมากเพียง 0.2 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตจะมีค่าลดลงในระยะการเจริญทวีคูณ ในขณะที่เซลล์มีการสังเคราะห์โปรตีนเพิ่มขึ้น



รูปที่ 10 แสดงรูปแบบการเจริญและการผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 สัมพันธ์กับปริมาณฟรุกโตสและแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร เสริมด้วย nutrient broth 0.8 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที

3.9 ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์ เบต้า-คีโตไธโอเลส อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส และ ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส กับปริมาณโปรตีนที่สกัดแยกจาก *A.eutrophus* ATCC 17697

เมื่อทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส, อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส และไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนสในสารละลายที่สกัดแยกได้จาก *A.eutrophus* ATCC 17697 (วิธีข้อ 2.11) ที่อุณหภูมิ 30 °ซ จะได้ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของเอนไซม์กับอัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ทั้งสามชนิดดังแสดงในรูปที่ 11, 12 และ 13

3.10 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดแยกเอนไซม์จากเซลล์ *A.eutrophus* ด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง

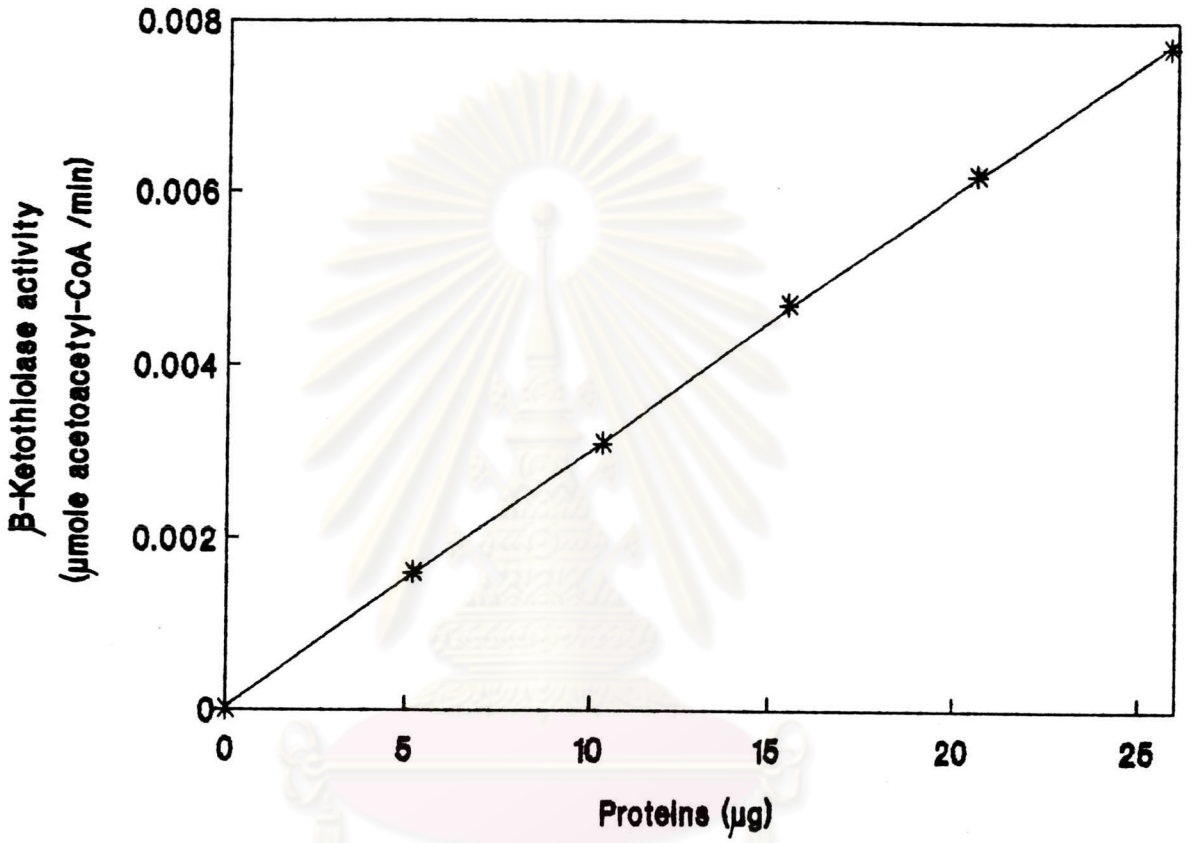
เก็บเซลล์ช่วงกลางอายุของการเจริญทวีคูณ (mid-log phase) ไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) (วิธีข้อ 2.10) ที่ 50 % duty cycle , output 3 เป็นเวลาต่าง ๆ กัน (1,2,4,6และ 8 นาที) สารละลายที่ได้นำไปปั่นแยก (12,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที) เพื่อเก็บสารละลายเอนไซม์นำมาวิเคราะห์โปรตีนและแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีบิวทิเรท ดีไฮโดรจีเนส

จากผลการทดลองในรูปที่ 14 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนสมีค่าแอคติวิตีรวมและแอคติวิตีจำเพาะสูงขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นในขณะที่ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเพื่อให้การสกัดเอนไซม์ได้ผลดีที่สุดจึงเลือกที่เวลา 8 นาที เนื่องจากให้ค่าแอคติวิตีรวมสูงและแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดและเริ่มคงที่แม้ว่าจะเพิ่มระยะเวลาของการทำให้เซลล์แตกอีกก็ตาม

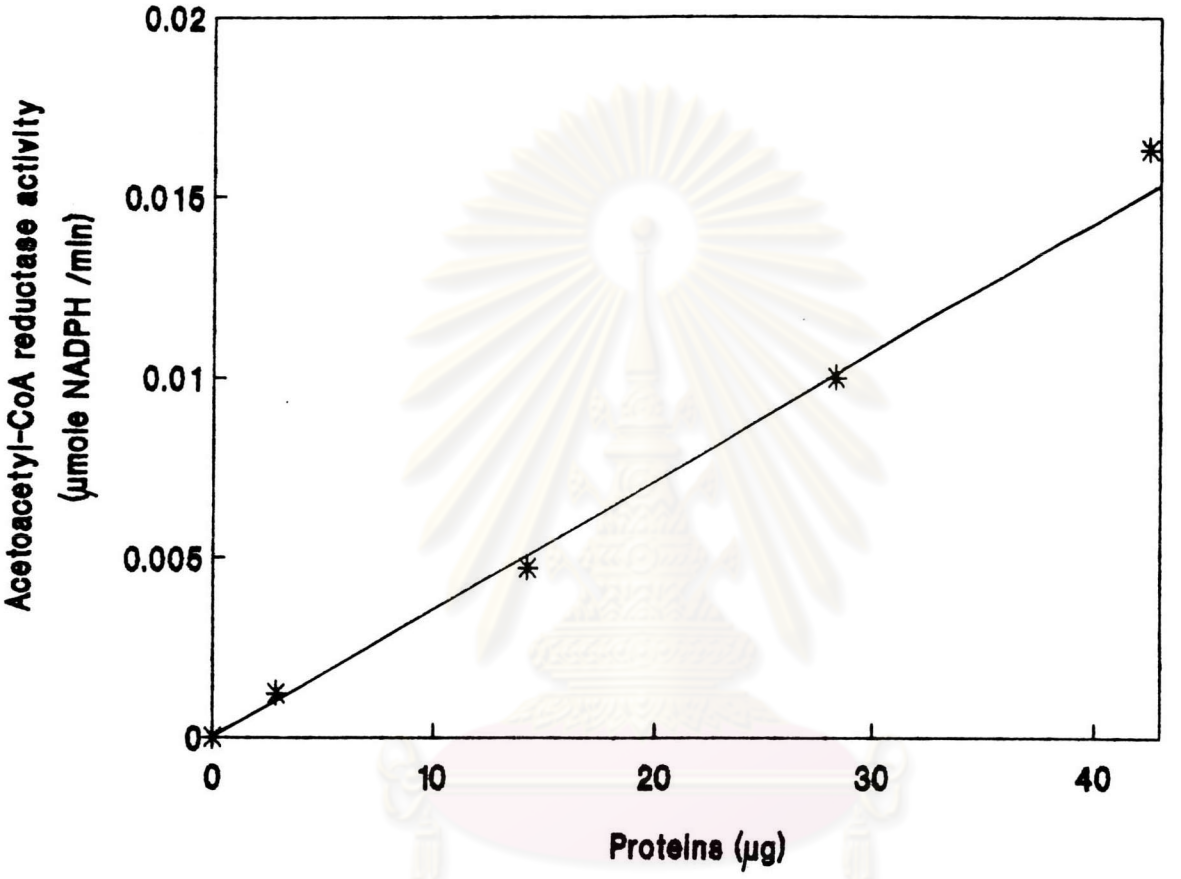
3.11 การศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส, อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตสและไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนสในสภาวะที่มีการสังเคราะห์ PHB แตกต่างกัน ใน *A.eutrophus* ATCC 17697

3.11.1 สภาวะของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร

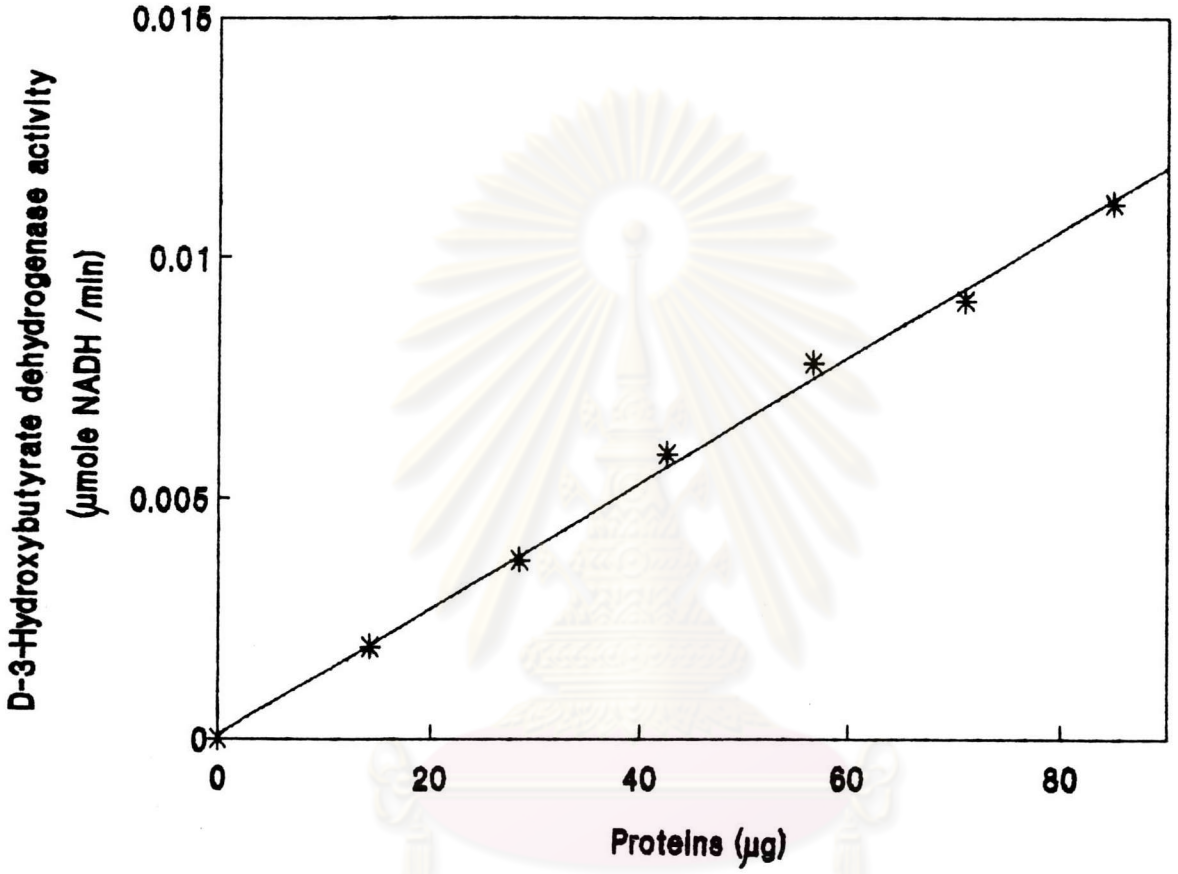
เพาะเลี้ยงเซลล์ *A.eutrophus* ATCC 17697 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °ซ (วิธีข้อ 2.6.3) เก็บเซลล์และนำมาทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง



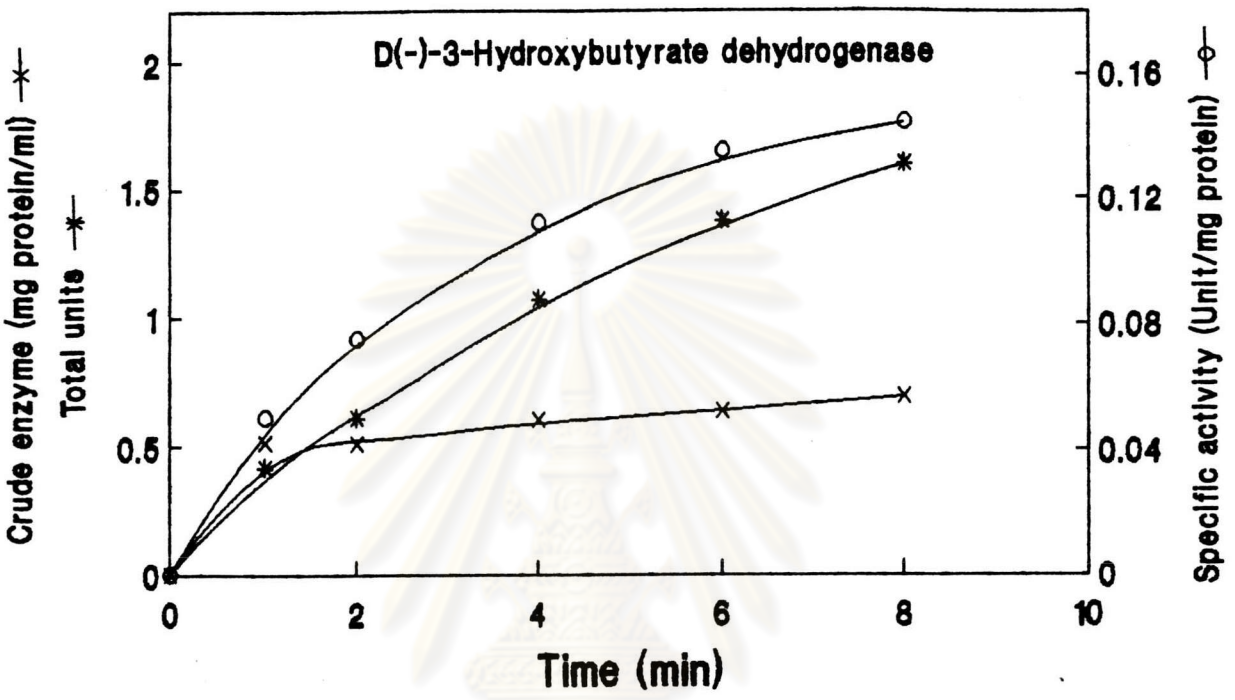
รูปที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 กับปริมาณโปรตีนวัดแอคติวิตี (วิธีข้อ 2.11.1) โดยใช้อะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอเป็นสับสเตรท



รูปที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 กับปริมาณโปรตีนวัดแอคติวิตี (วิธีข้อ 2.11.2) โดยใช้อะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอเป็นสับสเตรท



รูปที่ 13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 กับปริมาณโปรตีนวัดแอคติวิตี (วิธีข้อ 2.11.3) โดยใช้ดีแอล-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรทเป็นสับสเตรท



รูปที่ 14 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงเพื่อสกัดแยกเอนไซม์ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนสออกจากเซลล์ *A.eutrophus*

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กำเนิดเสียงความถี่สูงแล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง (วิธีข้อ 2.11)

จากการทดลอง (รูปที่ 15) พบว่า *A.eutrophus* สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส, อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส และไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนสได้ โดยที่อัตราการเพิ่มค่าแอคติวิตีจำเพาะของเบต้า-คีโตไธโอเลสจะสัมพันธ์กับปริมาณการเพิ่มการสะสมของ PHB ในช่วงแรกกล่าวคือเมื่อเซลล์มีการผลิต PHB เพิ่มมากขึ้น (ในระยะการเจริญทวิคูณ) และสังเคราะห์ PHB สูงสุด (15-16 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งที่เวลา 40 ชั่วโมง) จะมีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด ประมาณ 3.11 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนหลังจากนั้นแอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วจนเหลือประมาณ 50 เปอร์เซนต์เท่า ในเวลา 20 ชั่วโมงแล้วจะมีค่าคงที่ในขณะที่ค่า PHB สะสมไม่เปลี่ยนแปลงมากนักสำหรับอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตสจะมีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงขึ้นในช่วงแรกที่มีการสังเคราะห์ PHB เพิ่มขึ้นและสูงสุดที่เวลา 30 ชั่วโมง ($\simeq$ 1.4 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) แล้วจะลดลงในขณะที่ค่า PHB ยังคงสะสมสูงขึ้นต่อไป ค่าแอคติวิตีจำเพาะ อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตสจะลดลงประมาณ 50-60 เปอร์เซนต์ในชั่วโมงที่ 40-50 หลังจากนั้นจะคงที่ ในขณะที่เอนไซม์ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนสจะมีค่าแอคติวิตีจำเพาะไม่สูงนัก ($\simeq$ 0.1 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) และเซลล์ *A.eutrophus* จะผลิตเอนไซม์ชนิดนี้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 30 เช่นกันกับอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส แต่หลังจาก PHB สังเคราะห์สูงสุด (ชั่วโมงที่ 40) แล้ว จะตรวจไม่พบแอคติวิตีของไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนสเลย อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าในช่วงนี้มีการสังเคราะห์ PHB เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

3.11.2 <u>สภาวะของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัมต่อลิตร</u>

เพาะเลี้ยงเซลล์ *A.eutrophus* ATCC 17697 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัมต่อลิตร ในสภาวะและดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3.11.1

จากผลการทดลอง (รูปที่ 16) พบว่าในระยะการเจริญทวิคูณค่าแอคติวิตีจำเพาะของเบต้า-คีโตไอโอเลสจะสัมพันธ์กับการสะสม PHB คือ จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง และที่เวลา 40 ชั่วโมงซึ่งเซลล์สังเคราะห์ PHB ได้สูงสุดและเพิ่มขึ้นจาก 15 ไปเป็น 30 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งจะพบแอคติวิตีของเบต้า-คีโตไธโอเลสเพิ่มขึ้นและมีค่าสูงสุดเช่นกัน (ประมาณ 12.72 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) หลังจากนั้นแอคติวิตีจะลดลงเล็กน้อยแล้วคงที่ ในขณะที่อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด 2.14 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในชั่วโมงที่ 30 หลังจากนั้นจะลดลงเล็กน้อยและไม่เปลี่ยนแปลงมากนักจนถึงชั่วโมงที่ 70

รูปที่ 15 รูปแบบการผลิตเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส, อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส, ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส, ค่าความขุ่น, น้ำหนักแห้งของเซลล์ , ปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์และ PHB ที่ระยะต่าง ๆ ของการเจริญของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรในสภาวะของการเพาะเลี้ยง ข้อ 3.11.1

Crude enzyme (mg protein/ml)
Specific activity (Unit/mg protein)
Time (hours)
Poly-β-hydroxybutyrate content
(% dry bacterial wt.)
A436
Dry weight (g/5ml)
D(-)-3-Hydroxybutyrate dehydrogenase
Acetoacetyl-CoA reductase
β-Ketothiolase

รูปที่ 16 รูปแบบการผลิตเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส, อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส, ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส, ค่าความขุ่น, น้ำหนักแห้งของเซลล์ , ปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์และ PHB ที่ระยะต่าง ๆ ของการเจริญของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัมต่อลิตรในสภาวะของการเพาะเลี้ยงข้อ 3.11.2

Crude enzyme (mg protein/ml)
Specific activity (Unit/mg protein)
Time (hours)
D(-)-3-Hydroxybutyrate dehydrogenase
Acetoacetyl-CoA reductase
β-Ketothiolase
Poly-β-hydroxybutyrate content
(% dry bacterial wt.)
A436
Dry weight (g/5ml)

ส่วนไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส จะมีค่าแอคติวิตีจำเพาะคงที่ตลอดช่วงการเจริญเมื่อติดตามเป็นระยะเวลานานตั้งแต่ 20-70 ชั่วโมง (≃ 0.9 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน)

3.11.3 สภาวะของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร และเสริมด้วย NB 8 กรัมต่อลิตร

เพาะเลี้ยงเซลล์ *A.eutrophus* ATCC 17697 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร เสริมด้วย NB 8 กรัมต่อลิตร ในสภาวะและดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3.11.1

จากผลการทดลอง (รูปที่ 17) จะเห็นได้ว่าเซลล์ *A.eutrophus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่เสริมด้วย NB จะมีการเจริญสูงมาก โดยที่การสังเคราะห์ PHB ซึ่งตรวจพบได้ในชั่วโมงที่ 15 และมีค่าสูงสุดประมาณ 6-7 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งในชั่วโมงที่ 30 หลังจากนั้นเกือบจะไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก และเมื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ พบว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะของเบต้า-คีโตไธโอเลสและอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตสจะมีค่าเริ่มต้นสูง (≃ 1.09 และ 0.41 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์นานขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 30 แอคติวิตีจำเพาะจะลดลง (เกือบ 50 เปอร์เซนต์) แล้วจะมีค่าไม่เปลี่ยนแปลงมากนักสอดคล้องกับการสังเคราะห์ PHB ดังกล่าวข้างต้น ในขณะที่ตรวจไม่พบแอคติวิตีของไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนสอย่างมีนัยสำคัญเลย

3.11.4 สภาวะของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรอุดม

เพาะเลี้ยงเซลล์ *A.eutrophus* ATCC 17697 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอุดมที่ประกอบด้วย NB 8 กรัมต่อลิตร ในสภาวะและดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3.11.1

จากผลการทดลอง (รูปที่ 18) จะพบว่าในสภาวะของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรอุดมซึ่งเซลล์มีการเจริญเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดได้ภายในเวลาอันรวดเร็ว จะพบแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส, อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตสและไฮดรอกซีบิวทิเรท-ดีไฮโดรจีเนสมีค่าเพิ่มขึ้นและคงที่ที่เวลาประมาณ 16 ชั่วโมงทั้ง 3 เอนไซม์ โดยมีค่าแอคติวิตีสูงสุดประมาณ 1.8,0.7 และ 0.9-1.0 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร จะพบว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลสและอะซิโตอะซิติลเอรีดักเตสมีค่าใกล้เคียงกัน ในขณะที่แอคติวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนสเพิ่มขึ้นประมาณ 10 เท่า ซึ่งมีผลให้ปริมาณ PHB ที่สะสมมีปริมาณลดลงตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงอย่างเห็นได้ชัดจนเกือบตรวจไม่พบ PHB เลยที่เวลาของการเพาะเลี้ยงนาน 20 ชั่วโมง

รูปที่ 17 รูปแบบการผลิตเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส, อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส, ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส, ค่าความขุ่น , น้ำหนักแห้งของเซลล์ , ปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์ และ PHB ที่ระยะต่าง ๆ ของการเจริญของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรเสริมด้วย NB 8 กรัมต่อลิตรในสภาวะของการเพาะเลี้ยง ข้อ 3.11.3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 18 รูปแบบการผลิตเอ ไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส, อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส, ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส, ค่าความขุ่น, น้ำหนักแห้งของเซลล์ ,ปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์และ PHB ที่ระยะต่าง ๆ ของการเจริญของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรอุดมในสภาวะของการเพาะเลี้ยงข้อ 3.11.4

Crude enzyme (mg protein/ml)
Specific activity (Unit/mg protein)
D(-)-3-Hydroxybutyrate dehydrogenase
Acetoacetyl-CoA reductase
β-Ketothiolase
Poly-β-hydroxybutyrate content
(% dry bacterial wt.)
A436
Dry weight (g/5ml)
Time (hours)

3.11.5 สภาวะของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร เสริมด้วยกรดบิวทิริค 1 กรัมต่อลิตร

เพาะเลี้ยงเซลล์ *A.eutrophus* ATCC 17697 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร เสริมด้วยกรดบิวทิริค 1 กรัมต่อลิตรในสภาวะและดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3.11.1

จากผลการทดลอง (รูปที่ 19) จะพบว่าเซลล์ *A.eutrophus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเสริมด้วยกรดบิวทิริคจะมีการเจริญเพิ่มขึ้นตลอดเวลาดังจะสังเกตได้จากค่าความขุ่นที่เพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอ (ที่เวลา 20-70 ชั่วโมง) ในขณะที่การสังเคราะห์ PHB มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากชั่วโมงที่ 20 และจะมีการสะสม PHB คงที่ประมาณ 16-17 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง (ชั่วโมงที่ 30-70) โดยเมื่อพิจารณาระดับของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องจะเห็นว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลสจะลดลงอย่างเด่นชัดหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ นาน 40 ชั่วโมง ในขณะที่ค่าแอคติวิตีจำเพาะของอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตสจะมีค่าลดลงเช่นกันแต่ไม่เปลี่ยนแปลงมากนักตลอดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง สำหรับไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนสค่าแอคติวิตีก็จะลดลงอย่างรวดเร็วเช่นกันในช่วงที่การสังเคราะห์ PHB เกือบคงที่

3.12 การศึกษาการเจริญของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ในอาหารสูตรเกลือแร่ซึ่งมีกรดคาร์บอกซิลิค (Carboxylic acid) เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเกลือแร่ (วิธีข้อ 2.6.3) โดยเติมกรดคาร์บอกซิลิคได้แก่ กรดโปรปิโอนิค (propionic acid), กรดบิวทิริค (butyric acid) และกรดวาเลอริค (valeric acid) เป็นแหล่งคาร์บอนแทนฟรุกโตส (ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 50 ชั่วโมง (ตารางที่ 5) พบว่า เซลล์ไม่สามารถที่จะเจริญโดยใช้กรดคาร์บอกซิลิคทั้งสามชนิดเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนได้ แม้ว่าจะทำการเพาะเลี้ยงต่อไปถึง 190 ชั่วโมง (ค่าความขุ่นเมื่อเจริญในกรดโปรปิโอนิค, กรดบิวทิริค และกรดวาเลอริคที่เวลา 190 ชั่วโมง เป็น 0.011, 0.021 และ 0.012 ตามลำดับ) ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเดี่ยว ๆ ทดแทนฟรุกโตส

รูปที่ 19 รูปแบบการผลิตเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส, อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส, ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส, ค่าความขุ่น, น้ำหนักแห้งของเซลล์ ,ปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์และ PHB ที่ระยะต่าง ๆ ของการเจริญของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร เสริมด้วยกรดบิวทิริค 1 กรัมต่อลิตร ในสภาวะของการเพาะเลี้ยง ข้อ 3.11.5

Crude enzyme (mg protein/ml)
Specific activity (Unit/mg protein)
D(-)-3-Hydroxybutyrate dehydrogenase
Acetoacetyl-CoA reductase
β-Ketothiolase
Poly-β-hydroxybutyrate content
(% dry bacterial wt.)
Time (hours)
A436
Dry weight (g/5ml)

ตารางที่ 5 ค่าการเจริญของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ที่เวลา 50 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ และใช้กรดคาร์บอกซิลิคเป็นแหล่งคาร์บอนเทียบกับฟรุกโตสในสภาวะเดียวกันกับข้อ 3.1

แหล่งคาร์บอน	A_{436}	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/5 มิลลิลิตร)
ฟรุกโตส	7.01	0.0093
กรดโปรปิโอนิค	0.029	0.0013
กรดบิวทิริค	0.029	0.0008
กรดวาเลอริค	0.022	0.0011

3.13 <u>ผลของกรดคาร์บอกซิลิคต่อการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ใน *A.eutrophus* ATCC 17697</u>

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร และเสริมด้วยกรดคาร์บอกซิลิค 1 กรัมต่อลิตร ในสภาวะเดียวกันกับข้อ 3.1 เป็นเวลา 50 ชั่วโมง (ตารางที่ 6) ผลการทดลองพบว่าเซลล์สามารถเจริญได้ตามปรกติ และเมื่อนำไปวิเคราะห์รูปแบบของการสังเคราะห์ 3HB และ 3HV โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟีจะพบว่า เมื่อใช้กรดบิวทิริคเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับฟรุกโตสจะเพิ่มการสังเคราะห์หน่วยของ 3HB ในโคพอลิเมอร์ในขณะที่การใช้กรดโปรปิโอนิคและกรดวาเลอริคจะเพิ่มการสังเคราะห์หน่วยของ 3HV แทนโดยที่กรดวาเลอริคจะเพิ่ม 3HV ได้มากกว่ากรดโปรปิโอนิค เมื่อเทียบกับการใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

โดยเมื่อพิจารณาค่าความสัมพันธ์ (correlation factor ; C.F.) ระหว่างการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟีกับ spectrophotometry จะพบว่า C.F. มีค่าประมาณ 1.92 ± 0.065 เมื่อจำนวนตัวอย่าง (n) เท่ากับ 9

ดังนั้นจะเห็นว่าอัตราการสังเคราะห์ PHV เมื่อมีและไม่มีกรดบิวทิริคเป็นแหล่งต้นตอจะมีค่าไม่แตกต่างกันการเติมกรดบิวทิริคจะมีผลไปเพิ่มการสังเคราะห์ PHB ประมาณ 5 เปอร์เซนต์ ในขณะที่การเติมกรดโปรปิโอนิคและกรดวาเลอริคจะมีผลไปลดเปอร์เซนต์ของ PHB แต่เพิ่มเปอร์เซนต์ของ PHV ขึ้นได้เล็กน้อยเช่นกัน

ตารางที่ 6 รูปแบบและปริมาณการสังเคราะห์ 3HB และ 3HV ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ที่เวลา 50 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ ที่ประกอบด้วย ฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร และเสริมด้วยกรดคาร์บอกซิลิค 1 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที

แหล่งคาร์บอน	%3HB benzoic acid	%PHB(w/w)	%3HV benzoic acid	%PHV(w/w)
ฟรุกโตส	42.36	26.88	35.67	18.70
ฟรุกโตส + กรดโปรปิโอนิค	36.84	23.20	41.58	21.64
ฟรุกโตส + กรดบิวทิริค	44.59	31.63	31.44	18.43
ฟรุกโตส + กรดวาเลอริค	30.14	19.08	47.00	24.58

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย