บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) ที่มีสัดส่วนโดยโมลของ 3HV สูง จากเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ในถังหมัก เพื่อให้สามารถควบคุมสัดส่วนโดยโมลของ 3HV เมื่อนำโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ไปผสมกับ PHA ชนิดอื่นๆ ตามวัตถุประสงค์ในการประยุกต์ใช้งาน โดยศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเจริญ การผลิต P(3HB-co-3HV) และสัดส่วนโดยโมลของ 3HV จากผลการวิจัยสามารถสรุปได้ดังนี้

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.55 ชั่วโมง$^{-1}$ ที่เวลา 12 ชั่วโมง จึงเลือกใช้กล้าเชื้ออายุ 12 ชั่วโมง เพื่อการผลิต P(3HB-co-3HV) ในถังหมักต่อไป

การศึกษาในถังหมักแบบแบช

เชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิต P(3HB-co-3HV) ได้โดยเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลทรายสำหรับการเจริญและการสังเคราะห์โมโนเมอร์ 3HB ร่วมกับโซเดียมโพรพิโอเนตหรือโซเดียมวาเลอเรตซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์โมโนเมอร์ 3HV จากการแปรความเข้มข้นของสารตั้งต้นแต่ละชนิดพบว่าโซเดียมวาเลอเรตให้สัดส่วนโดยโมลของ 3HV สูงกว่าการใช้โซเดียมโพรพิโอเนตเป็นสารตั้งต้น เมื่อพิจารณาวิถีการสังเคราะห์โมโนเมอร์ของ 3HV (ดังแสดงในรูปที่ 6) โซเดียมวาเลอเรตสามารถเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ได้โดยผ่านทางวาเลอริลโคเอและถูกเปลี่ยนไปเป็นโมโนเมอร์ 3HV ได้ง่ายกว่า เมื่อเทียบกับโพรพิโอนิลโคเอที่ต้องรวมกับอะเซทิลโคเอก่อนถูกเปลี่ยนเป็นโมโนเมอร์ 3HV (Braunegg และคณะ, 1998) แต่การเลือกใช้โซเดียมวาเลอเรตเป็นสารตั้งต้นมีข้อเสียเปรียบเรื่องความเป็นพิษต่อเซลล์ หากใช้ความเข้มข้นที่มากเกินไปจึงจำเป็นต้องควบคุมความเข้มข้นไม่ให้อยู่ในระดับที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากเกินไป (Doi, 1990) ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของโซเดียมวาเลอเรตที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB-co-3HV) โดยเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 เท่ากับ 5 กรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำตาลทรายเข้มข้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร

การเติมโซเดียมซิเตรต เท่ากับ 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตรในอาหารเพื่อการผลิต พบว่ามีการเจริญ และการผลิตโคพอลิเมอร์P(3HB-co-3HV) โดยเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโซเดียมซิเตรตอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองที่ไม่เติมโซเดียมซิเตรต (ชุดควบคุม) โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 7.89 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของโคพอลิเมอร์เท่ากับ 1.74 กรัมต่อลิตร และปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ22.05 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ แต่พบว่าสัดส่วนโดยโมลของ 3HV ลดลงจาก 40 โมลเปอร์เซนต์ในชุดควบคุมเป็น 13 โมลเปอร์เซนต์ ผลการทดลองการเติมโซเดียมซิเตรตสอดคล้องกับการรายงานของอติพล บุณเรืองถาวร (2543) ที่ศึกษาการผลิต PHB โดยเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ได้ปริมาณ PHB เพิ่มสูงถึง 60 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเติมโซเดียมซิเตรตเป็นซับพลีเมนต์ Doi (1990) สันนิษฐานว่าโซเดียมซิเตรตเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ช่วยให้เซลล์ไม่ต้องนำอะเซทิลโคเอมาสังเคราะห์กรดซิตริก ทำให้มีอะเซทิลโคเอเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์โมโนเมอร์3HB ได้มาก Kim และคณะ (1996) รายงานว่าการเติมโซเดียมซิเตรตมีผลต่อการกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าคีโตไทโอเลส และอะซิโตอะเซทิลโคเอรีดักเตส นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับผลการศึกษาการผลิต PHA โดยจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น*Alcaligenes eutrophus* H16 (Kim และคณะ, 1994; Ryu และคณะ, 1997) *Alcaligenes latus* (Wang และ Lee, 1997a) *Azotobacter chroococum* H23 (Martinez-Toledo และคณะ, 1995; Kim และ Chang, 1998; Savenkova และคณะ, 1999) recombinant *E. coli* (Wang และ Lee, 1997b)

การเติมโซเดียมอะซิเตตเท่ากับ 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตรในอาหารเพื่อการผลิต พบว่ามีการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองที่ไม่เติมโซเดียมอะซิเตต (ชุดควบคุม) การผลิต P(3HB-co-3HV) เพิ่มสูงขึ้นตามความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตต โดยได้ความเข้มข้นและปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ0.55 กรัมต่อลิตร และ 18.46 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ โดยพบว่าสัดส่วนโดยโมลของ 3HV ลดลงเหลือ 18 โมลเปอร์เซนต์ (จาก 40 โมลเปอร์เซนต์ในชุดควบคุม) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของพิสิษฐ คงกำเนิด (2540) ที่ผลิต P(3HB-co-3HV) โดย *Bacillus* sp. BA-019 ในระดับขวดเขย่า ซึ่งรายงานว่าการเติมโซเดียมอะซิเตตไม่เพิ่มการผลิตของ P(3HB-co-3HV) Assobhei และคณะ (1998) พบว่าโซเดียมอะซิเตตมีผลไปชะลอการใช้กลูโคสในการเลี้ยง *Clostidium acetobutylicum* ATCC 824 ซึ่งทำให้มีการเจริญช้าลง ในขณะที่Yim และคณะ (1996) ทำการผลิต P(3HB-co-3HV) โดยเชื้อ recombinant *E. coli* พบว่าโซเดียมอะซิเตตมีผลทำให้สัดส่วนโดยโมลของ 3HV สูงขึ้นเนื่องจากเมื่อเซลล์นำโซเดียมอะซิเตตไปใช้เป็นอะเซทิลโคเอโดย

เอนไซม์อะเซทิลโคเอซินทิเทส เอนไซม์นี้สามารถเปลี่ยนโซเดียมโพรพิโอเนตเป็นโพรพิโอนิลโคเอ แล้วเข้าสู่เซลล์ จากนั้นจึงเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์โมโนเมอร์ 3HV ทำให้ได้สัดส่วนโดยโมลของ 3HV สูง ซึ่งแตกต่างจากผลของงานวิจัยนี้ คาดว่าน่าจะเกิดจากการใช้สารตั้งต้นเป็นโซเดียมวาเลอเรตซึ่งมีจำนวนคาร์บอนอะตอมมากกว่าโซเดียมโพรพิโอเนตทำให้ไม่ถูกเอนไซม์อะเซทิลโคเอซินทิเทสเปลี่ยนเป็นวาเลอริลโคเอ ส่วน อะเซทิลโคเอที่ได้จากโซเดียมอะซิเตตจะเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์โมโนเมอร์ของ 3HB ทำให้ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงขึ้น (เป็นสัดส่วนโดยโมลของ 3HB) แต่สัดส่วนโดยโมลของ 3HV ลดลง สำหรับการเจริญที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยนั้นอาจเนื่องมาจากผลของการยับยั้งการใช้น้ำตาลของโซเดียมอะซิเตต

การเติมกรดโอเลอิกเท่ากับ 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตรในอาหารเพื่อการผลิตเป็นซับพลีเมนต์ พบว่ามีการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 สูงกว่าการทดลองที่ไม่เติมกรดโอเลอิก (ชุดควบคุม) การผลิต P(3HB-co-3HV) เพิ่มสูงขึ้นตามความเข้มข้นของกรดโอเลอิก ได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.82 กรัมต่อลิตร และปริมาณสูงสุดเท่ากับ 19.39 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่พบว่าสัดส่วนโดยโมลของ 3HV ลดลงจาก 40 โมลเปอร์เซนต์ในชุดควบคุม เป็น 12 โมลเปอร์เซนต์ สอดคล้องกับการทดลองของ Lee และคณะ (1995) ที่ผลิต PHB โดยใช้ recombinant *E. coli* เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อมีการเติมกรดโอเลอิกลงในอาหารเพื่อการผลิตทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงขึ้น รวมถึงการผลิต PHB ก็สูงขึ้นด้วยเช่นกัน โดย Lee และคณะได้ให้ข้อสันนิษฐานไว้ว่า การเติมกรดโอเลอิกอาจส่งผลยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมันจากอะเซทิลโคเอ ทำให้อะเซทิลโคเอเข้าสู่วัฏจักรเครบส์และวิถีการสังเคราะห์ PHB มากขึ้น เมื่อพิจารณาถึงวิถีการสังเคราะห์และย่อยสลายกรดไขมันที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เซลล์สามารถสังเคราะห์กรดไขมันได้โดยอาศัยอะเซทิลโคเอเป็นสารตั้งต้น (Lehninger, 1993) ดังนั้นหากเซลล์ต้องการกรดไขมันจำนวนมากจะทำให้อะเซทิลโคเอภายในเซลล์ถูกใช้ไปอย่างมาก ในขณะที่วิถีการย่อยสลายกรดไขมันโดยปฏิกริยาบีต้าออกซิเดชั่นจะทำให้ได้อะเซทิลโคเอ และพลังงานจำนวนมาก (Voet และ Voet, 1995) ดังนั้นการเติมกรดโอเลอิกลงในอาหารเพื่อการผลิตอาจทำให้กรดโอเลอิกถูกนำไปใช้ในรูปของกรดไขมันโดยตรง มีผลให้วิถีการสังเคราะห์กรดไขมันภายในเซลล์ถูกยับยั้ง หรือกรดโอเลอิกเข้าสู่ปฏิกริยาเบต้าออกซิเดชั่นทำให้ได้อะเซทิลโคเอ ทำให้อะเซทิลโคเอถูกนำไปใช้เพื่อการเจริญและสังเคราะโมโนเมอร์ 3HB เพิ่มมากขึ้น

อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์โมโนเมอร์ของ 3HV มีค่าเท่ากับ 30 และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและความ

เข้มข้นของ P(3HB-co-3HV) เท่ากับ 4 ในขณะที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 60 และ 100 ให้ปริมาณ P(3HB-co-3HV) สูงที่สุด Doi (1990) สรุปผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนว่ามีผลต่อการเจริญและการผลิต P(3HB-co-3HV) ทั้งนี้เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Quaglino และ Miyazaki (1997) ซึ่งรายงานว่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงสามารถเพิ่มปริมาณ P(3HB-co-3HV) ได้สูงสุดเท่ากับ 63.5 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

การศึกษาในถังหมักแบบเฟดแบช

จากผลการทดลองพบว่าการใช้อาหารป้อนเข้าที่มีแหล่งไนโตรเจนอยู่ด้วยให้การเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 การผลิต P(3HB-co-3HV) รวมถึงสัดส่วนโดยโมลของ 3HV ดีกว่าการใช้อาหารป้อนเข้าที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน โดยมีการเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV) ดีที่สุดเมื่อใช้อาหารป้อนเข้าที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 15 พบว่าสัดส่วนโดยโมลของ 3HV ที่สังเคราะห์ได้สูงสุดเท่ากับ 44 โมลเปอร์เซนต์เมื่อใช้อาหารป้อนเข้าที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30 นั่นคือค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำ หมายถึงมีปริมาณไนโตรเจนสูงทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตได้ดีและเพิ่มการผลิต P(3HB-co-3HV) ด้วย สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rhee และคณะ(1993) ที่เลี้ยง *Alcaligenes* sp. SH-69 เพื่อผลิต P(3HB-co-3HV) โดยการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบชซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าหลังจากการเจริญของเซลล์ชั่วโมงที่ 20 ได้เติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมกับการเติมกลูโคส ผลที่ได้คือเมื่อเติมสารอาหารที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำทำให้ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูง

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลทรายเป็น 200 และ 400 กรัมต่อลิตรในอาหารป้อนเข้า เปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลทราย 100 กรัมต่อลิตร พบว่าการใช้น้ำตาลทราย 400 กรัมต่อลิตรมีผลให้การเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV) ดีที่สุด ในขณะที่การใช้น้ำตาลทราย 200 กรัมต่อลิตรให้การผลิต P(3HB-co-3HV) ใกล้เคียงกับการใช้น้ำตาลทราย 400 กรัมต่อลิตร แม้ว่าจะมีการเจริญที่น้อยกว่า แต่มีการสังเคราะห์โมโนเมอร์3HV สูงกว่า ซึ่งผลที่ได้นี้เป็นไปในทำนองเดียวกันกับผลงานวิจัยของสุดา สุภาชวินสวัสดิ์ (2542) ที่เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 เพื่อการผลิต P(3HB-co-3HV) ในระดับขวดเขย่า รวมทั้งรายงานของ Shimizu และคณะ (1998) ซึ่งเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* เพื่อการผลิต P(3HB-co-3HV) แบบเฟดแบช

ผลของการเติม trace element 2 มิลลิลิตรต่อลิตรทำให้มีการสังเคราะห์ 3HV เพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ 65 โมลเปอร์เซนต์ ในขณะที่ให้การเจริญและการผลิต P(3HB-co-3HV) ใกล้เคียงกับการเติม trace element ปริมาณมากหรือน้อยกว่านี้ Beaulieu และคณะ (1995) ได้อธิบายถึงการใช้แหล่งคาร์บอนเช่นกากน้ำตาล ไซรัปต่างๆ ในการเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* เพื่อการผลิต P(3HB-co-3HV) ว่าได้ผลดีกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนบริสุทธิ์เนื่องจาก trace element ในแหล่งคาร์บอนเหล่านั้นมีความสำคัญต่อเอนไซม์บางชนิดซึ่งอาจมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ การผลิตP(3HB-co-3HV) และการสังเคราะห์โมโนเมอร์ 3HV นอกจากนี้แล้วในการผลิตพอลิเมอร์และการสังเคราะห์โมโนเมอร์ยังขึ้นกับปัจจัยอื่นที่สำคัญได้แก่ ชนิดจุลินทรีย์ สารอาหาร และภาวะการเลี้ยงเชื้อ สำหรับเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 จากผลการศึกษาในงานวิจัยนี้พบว่าปัจจัยต่างๆหลายประการที่ศึกษามีผลมาก หรือน้อย หรือไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ ต่อการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) และต่อการสังเคราะห์โมโนเมอร์ 3 HV ดังที่รายงานในผลการทดลองแล้ว ซึ่งปัจจัยที่มีผลในการเพิ่มการสังเคราะห์ 3HV ที่เห็นได้ชัดเจน ได้แก่ การเติม trace element ความเข้มข้นที่เหมาะสมในอาหารป้อนเข้าขณะที่เลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบช แต่กลไกในการทำให้สังเคราะห์ 3HV เพิ่มขึ้นมากน้อยอย่างไรนั้น ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด รวมทั้งเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้ใหม่ และยังไม่มีการศึกษาวิถีการสังเคราะห์ PHA .ในเชื้อนี้

สรุปผลการวิจัย

1. *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) ได้ โดยสารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์ 3HV คือ โซเดียมวาเลอเรตความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร

2. การเติมโซเดียมซิเตรต โซเดียมอะซิเตต และกรดโอเลอิก มีผลทำให้การเจริญและการสังเคราะห์ 3HB เพิ่มขึ้น แต่ได้สัดส่วน 3HV ลดลง

3. อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญและการผลิตโคพอลิเมอร์ แต่ไม่มีผลต่อการสังเคราะห์ 3HV

ในการเลี้ยงแบบแบช อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมเท่ากับ 30

4. อาหารป้อนเข้าที่มีแหล่งไนโตรเจนให้ผลการเจริญและการผลิตโคพอลิเมอร์ที่ดีกว่าการใช้อาหารป้อนเข้าที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน โดยอาหารป้อนเข้าที่มีปริมาณไนโตรเจนคิดเป็นอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30 ให้สัดส่วนของ 3HV ดีที่สุด

5. ความเข้มข้นของอาหารป้อนเข้าที่เพิ่มขึ้นทำให้ *Bacillus* sp. BA-019 มีการเจริญและการผลิต P(3HB-co-3HV) ที่ดีขึ้น แต่ลดการสังเคราะห์ 3HV ลงเล็กน้อย โดยอาหารป้อนเข้าที่มีน้ำตาลทราย 200 กรัมต่อลิตร โซเดียมวาเลอเรต 50 กรัมต่อลิตร มีผลให้การเจริญและการผลิตโคพอลิเมอร์สูงขึ้น

6. การเติม trace element 2 ml/l มีผลทำให้การสังเคราะห์ 3HV เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ได้สัดส่วนของ 3HV สูงสุดถึง 65 โมลเปอร์เซนต์

7. เฮกเซนเป็นตัวทำละลายที่ทำให้การแยกโคพอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 3HV ได้สูงที่สุด (79 โมลเปอร์เซนต์) ซึ่งดีกว่าการใช้ อะซิโตน เมทานอล หรือ เอทานอล

8. แผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 3HV สูงขึ้น มีผลทำให้ทำให้เปอร์เซ็นต์การยืดตัวสูงขึ้น ในขณะที่ค่าการต้านแรงดึง และค่ายังส์โมดูลัสลดลง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย