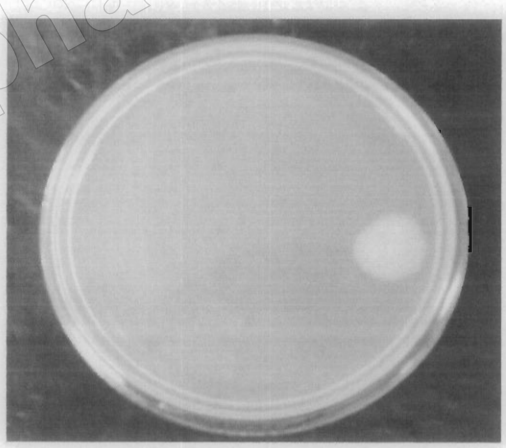
บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การเหนี่ยวนำแบคทีเรียด้วยสารเคมี และรังสีร่วมกับสารเคมี

1.1 การเหนี่ยวนำโดยการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน (ครั้งที่ 1)

จากการศึกษาการนำเชื้อ *A. latus* TISTR 1403 ที่ผ่านการได้รับสัมผัสรังสีแกมมาตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ของขวัญใจ แก้วจันทร์ และคณะ, 2554 (*A. latus* TISTR 1403/ γ-2AA) ซึ่งใช้ชื่อเรียกว่า สายพันธุ์เดิม มาทำการเหนี่ยวนำซ้ำโดยได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาแตกต่างกันทุก 1 นาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปเติมสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน (2AA) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 40 นาที พบว่า เชื้อที่ได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงเป็นเวลา 12 นาที ตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน มีการรอดชีวิตเพียง 1 ไอโซเลท ซึ่งมีขนาด 2.2 เซนติเมตร (ภาพที่ 4-1) ส่วนการสัมผัสของเชื้อที่ระยะเวลาอื่น ๆ ไม่พบการรอดชีวิตของเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 4-1



ภาพที่ 4-1 ลักษณะของโคโลนีที่ได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงเป็นเวลา 12 นาที ตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-1 การรอดชีวิตของเชื้อที่ได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที (ครั้งที่ 1)

วิธีการเหนี่ยวนำ	การเจริญของเชื้อในเพลต	จำนวนโคโลนี	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร)
UV 1 นาที + 2AA	O	-	-
UV 2 นาที + 2AA	O	-	-
UV 3 นาที + 2AA	O	-	-
UV 4 นาที + 2AA	O	-	-
UV 5 นาที + 2AA	O	-	-
UV 6 นาที + 2AA	O	-	-
UV 7 นาที + 2AA	O	-	-
UV 8 นาที + 2AA	O	-	-
UV 9 นาที + 2AA	O	-	-
UV 10 นาที + 2AA	O	-	-
UV 11 นาที + 2AA	O	-	-
UV 12 นาที + 2AA	+	1	2.2
UV 13 นาที + 2AA	O	-	-
UV 14 นาที + 2AA	O	-	-
UV 15 นาที + 2AA	O	-	-

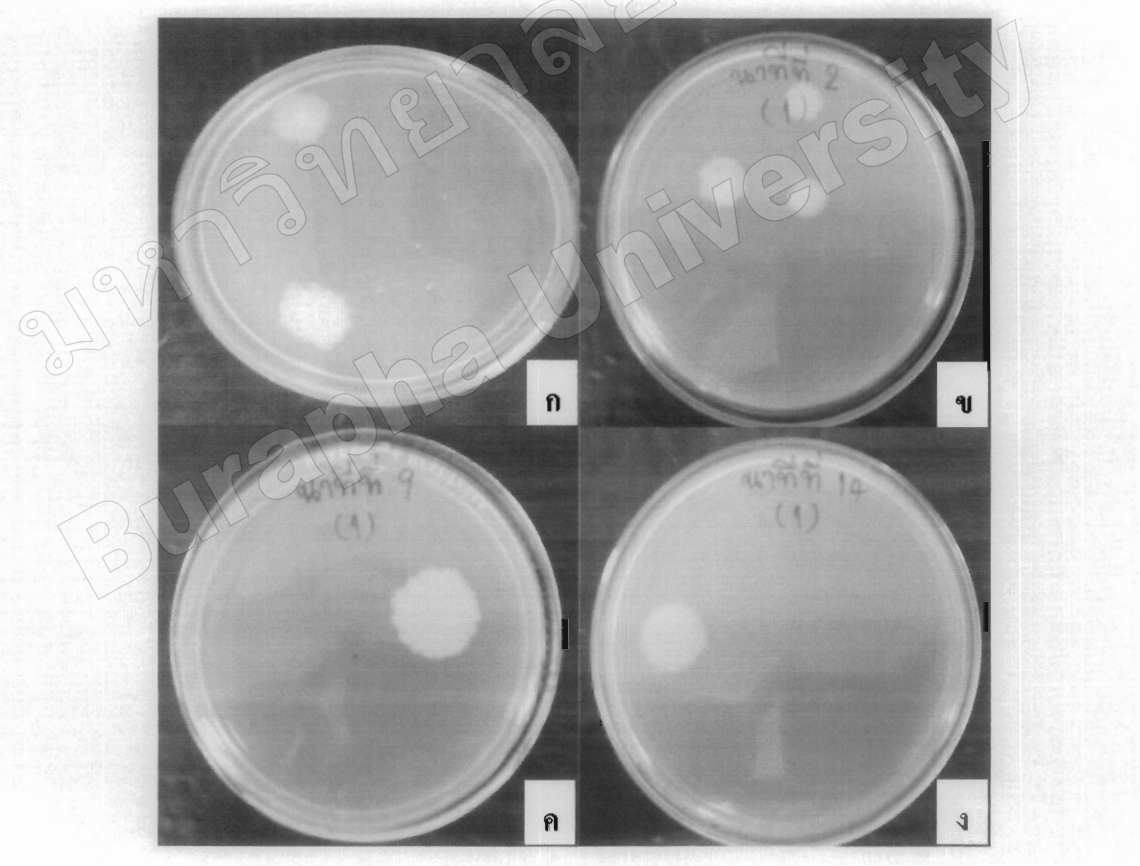
หมายเหตุ + เชื้อมีการเจริญ O ไม่มีการเจริญ

ดังนั้น จึงคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์เดิม (*A. latus* TISTR 1403/γ-2AA) ที่ผ่านการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงเป็นเวลา 12 นาที ตามด้วยการได้รับสัมผัสสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

1.2 การเหนี่ยวนำซ้ำโดยการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน (ครั้งที่ 2)

จากการนำเชื้อสายพันธุ์เดิมที่ผ่านการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง ตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ครั้งที่ 1 ซึ่งมีเพียง 1 โคโลนี มาทำการเหนี่ยวนำซ้ำโดยการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาแตกต่างกันทุก 1 นาที เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย

สาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 40 นาที พบว่า เชื้อที่ผ่านการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง ตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน มีการรอดของเชื้อจำนวน 7 ไอโซเลท คือ ที่เวลาการได้รับสัมผัส 1 นาที มีการรอดของเชื้อ จำนวน 2 ไอโซเลท (ภาพที่ 4-2ก) ที่เวลาการได้รับสัมผัส 2 นาที มีการรอดของเชื้อ จำนวน 3 ไอโซเลท (ภาพที่ 4-2ข) ที่เวลาการได้รับสัมผัส 9 นาที มีการรอดของเชื้อ จำนวน 1 ไอโซเลท (ภาพที่ 4-2ค) และที่เวลาการได้รับสัมผัส 14 นาที มีการรอดของเชื้อ จำนวน 1 ไอโซเลท (ภาพที่ 4-2ง) โดยเชื้อที่ผ่านการได้รับสัมผัสเป็นเวลา 9 นาที ตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที เชื้อมีขนาดโคโลนีใหญ่ที่สุด คือ 3.0 เซนติเมตร ส่วนการได้รับสัมผัสของเชื้อที่ระยะเวลาอื่น ๆ มีขนาดของโคโลนีใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 4-2



ภาพที่ 4-2 ลักษณะของโคโลนีที่ได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง ตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที โดย (ก) 1 นาที (ข) 2 นาที (ค) 9 นาที และ (ง) 14 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-2 การรอดชีวิตของเชื้อที่ได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที (ครั้งที่ 2)

วิธีการเหนี่ยวนำ	การเจริญของเชื้อในเพลต	จำนวนโคโลนี	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร)
UV 1 นาที + 2AA	+	2	1.4 และ 1.6
UV 2 นาที + 2AA	+	3	1.4, 1.5 และ 2.0
UV 3 นาที + 2AA	O	-	-
UV 4 นาที + 2AA	O	-	-
UV 5 นาที + 2AA	O	-	-
UV 6 นาที + 2AA	O	-	-
UV 7 นาที + 2AA	O	-	-
UV 8 นาที + 2AA	O	-	-
UV 9 นาที + 2AA	+	1	3.0
UV 10 นาที + 2AA	O	-	-
UV 11 นาที + 2AA	O	-	-
UV 12 นาที + 2AA	O	-	-
UV 13 นาที + 2AA	O	-	-
UV 14 นาที + 2AA	+	1	1.7
UV 15 นาที + 2AA	O	-	-

หมายเหตุ + เชื้อมีการเจริญ O ไม่มีการเจริญ

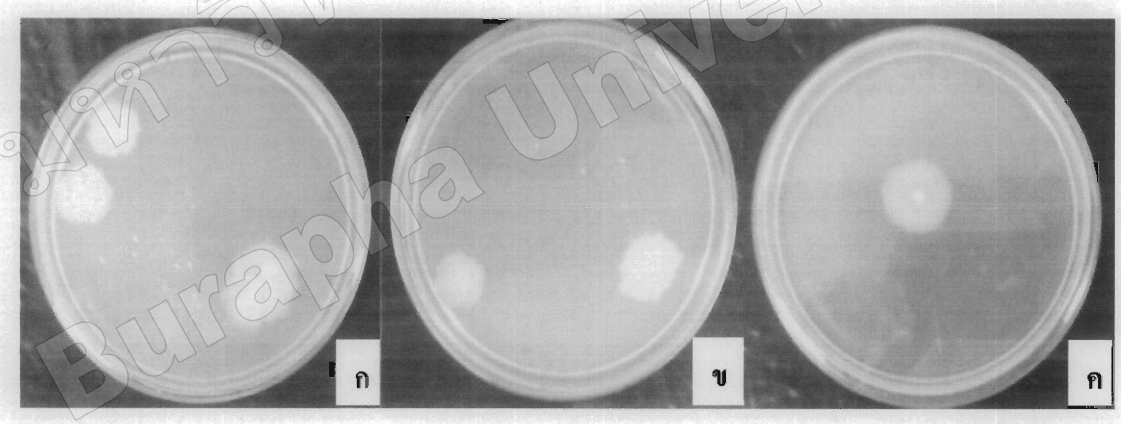
ดังนั้น จึงเลือกคัดเชื้อที่มีขนาดของโคโลนีที่ใหญ่ที่สุด คือ เชื้อที่ผ่านการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงเป็นเวลา 9 นาที ตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

1.3 การเหนี่ยวนำซ้ำโดยการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสารอะคริฟลาวิน รังสีเหนือม่วงตามด้วยสาร 5-โบรโมยูราซิล สารอะคริฟลาวิน และสาร 5-โบรโมยูราซิล

นำเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำซ้ำโดยการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน จำนวน 2 ครั้ง ที่คัดเลือกได้มาทำการเหนี่ยวนำซ้ำด้วยวิธีการแตกต่างกัน ได้แก่ การได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสารอะคริฟลาวิน การได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสาร 5-

โบรโมยูราซิล การได้รับสัมผัสสารอะคริฟลาวิน และการได้รับสัมผัสสาร 5-โบรโมยูราซิล ได้ผลดังนี้

- การได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสารอะคริฟลาวิน โดยใช้รังสีเหนือม่วงความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาแตกต่างกันทุก 1 นาที เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยสารอะคริฟลาวิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 40 นาที พบว่า เชื้อที่ผ่านการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง ตามด้วยสารอะคริฟลาวิน มีการรอดชีวิตของเชื้อจำนวน 6 ไอโซเลท คือ ที่เวลาการได้รับสัมผัส 1 นาที มีการรอดของเชื้อ จำนวน 3 ไอโซเลท (ภาพที่ 4-3ก) ที่เวลาการได้รับสัมผัส 5 นาที มีการรอดของเชื้อ จำนวน 2 ไอโซเลท (ภาพที่ 4-3ข) และที่เวลาการได้รับสัมผัส 8 นาที มีการรอดของเชื้อ จำนวน 1 ไอโซเลท (ภาพที่ 4-3ค) โดยเชื้อที่ผ่านการได้รับสัมผัสเป็นเวลา 8 นาที ตามด้วยสารอะคริฟลาวิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที มีโคโลนีขนาดใหญ่ที่สุด คือ 2.5 เซนติเมตร ส่วนการได้รับสัมผัสที่ระยะเวลาอื่น ๆ ไม่มีการรอดของเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 4-3



ภาพที่ 4-3 ลักษณะของโคโลนีที่ได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง ตามด้วยสารอะคริฟลาวิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที โดย (ก) 1 นาที (ข) 5 นาที และ (ค) 8 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-3 การรอดชีวิตของเชื้อที่ได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงร่วมกับสารอะคริฟลาวินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที

วิธีการเหนี่ยวนำ	การเจริญของเชื้อในเพลต	จำนวนโคโลนี	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร)
UV 1 นาที + Acri	+	3	1.5, 1.6 และ 2.0
UV 2 นาที + Acri	O	-	-
UV 3 นาที + Acri	O	-	-
UV 4 นาที + Acri	O	-	-
UV 5 นาที + Acri	+	2	1.2 และ 1.3
UV 6 นาที + Acri	O	-	-
UV 7 นาที + Acri	O	-	-
UV 8 นาที + Acri	+	1	2.5
UV 9 นาที + Acri	O	-	-
UV 10 นาที + Acri	O	-	-
UV 11 นาที + Acri	O	-	-
UV 12 นาที + Acri	O	-	-
UV 13 นาที + Acri	O	-	-
UV 14 นาที + Acri	O	-	-
UV 15 นาที + Acri	O	-	-

หมายเหตุ + เชื้อมีการเจริญ O ไม่มีการเจริญของเชื้อ

ดังนั้น จึงนำโคโลนีที่มีขนาดใหญ่ที่สุด คือ เชื้อที่ผ่านการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง เป็นเวลา 8 นาที ตามด้วยสารอะคริฟลาวิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที มาเก็บรักษาไว้ในอาหารวุ้นเอียง

- การได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง ตามด้วยสาร 5-โบรโมยูราซิล โดยใช้รังสีเหนือม่วงความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาแตกต่างกันทุก 1 นาที เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยสาร 5-โบรโมยูราซิล ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 40 นาที พบว่า เชื้อที่ผ่านการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง ตามด้วยสาร 5-โบรโมยูราซิล มีการรอดชีวิตของเชื้อจำนวน 14 ไอโซเลท คือ ที่เวลาการได้รับสัมผัส 5 นาที มีการรอดของเชื้อ จำนวน 2 ไอโซเลท (ภาพที่ 4-4ก) ที่เวลาการได้รับสัมผัส 8 นาที มีการรอดของเชื้อ จำนวน 2 ไอโซเลท (ภาพที่ 4-4ข) ที่เวลาการได้รับสัมผัส11 นาที มีการรอดของเชื้อ จำนวน 1 ไอโซเลท (ภาพที่ 4-4ค) ที่เวลาการได้รับสัมผัส 13 นาที มีการรอดของเชื้อ จำนวน 3 ไอโซเลท (ภาพที่ 4-4ง) ที่เวลาการได้รับสัมผัส 14 นาที มีการรอดของ

เชื้อ จำนวน 3 ไอโซเลท (ภาพที่ 4-4จ) และที่เวลาการได้รับสัมผัส 15 นาที มีการรอดของเชื้อจำนวน 3 ไอโซเลท (ภาพที่ 4-4ฉ) โดยเชื้อที่ผ่านการได้รับสัมผัสเป็นเวลา 11 นาที ตามด้วยสาร 5-โบรโมยูราซิล ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที มีโคโลนีขนาดใหญ่ที่สุด คือ 2.7 เซนติเมตร ส่วนการได้รับสัมผัสของเชื้อที่ระยะเวลาอื่น ๆ มีขนาดของโคโลนีใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 4-4

ภาพที่ 4-4 ลักษณะของโคโลนีที่ได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง ตามด้วยสาร 5-โบรโมยูราซิลความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที โดย (ก) 5 นาที (ข) 8 นาที (ค) 11 นาที (ง) 13 นาที (จ) 14 นาที และ (ฉ) 15 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-4 การรอดชีวิตของเชื้อที่ได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง ตามด้วยสาร 5-โบรโมยูราซิล ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที

วิธีการเหนี่ยวนำ	การเจริญของเชื้อในเพลต	จำนวนโคโลนี	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร)
UV 1 นาที + 5-bro	O	-	-
UV 2 นาที + 5-bro	O	-	-
UV 3 นาที + 5-bro	O	-	-
UV 4 นาที + 5-bro	O	-	-
UV 5 นาที + 5-bro	+	2	1.5 และ 1.6
UV 6 นาที + 5-bro	O	-	-
UV 7 นาที + 5-bro	O	-	-
UV 8 นาที + 5-bro	+	2	1.9 และ 2.0
UV 9 นาที + 5-bro	O	-	-
UV 10 นาที + 5-bro	O	-	-
UV 11 นาที + 5-bro	+	1	2.7
UV 12 นาที + 5-bro	O	-	-
UV 13 นาที + 5-bro	+	3	0.7, 1.2 และ 1.7
UV 14 นาที + 5-bro	+	3	0.5, 0.7 และ 0.9
UV 15 นาที + 5-bro	+	3	0.7, 0.9 และ 1.0

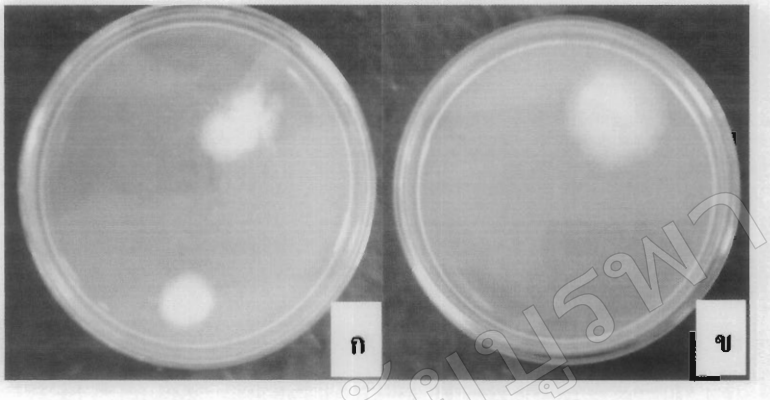
หมายเหตุ + เชื้อมีการเจริญ O ไม่มีการเจริญของเชื้อ

ดังนั้น จึงนำโคโลนีที่มีขนาดใหญ่ที่สุด คือ เชื้อที่ผ่านการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง เป็นเวลา 11 นาที ตามด้วยสาร 5-โบรโมยูราซิล ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที มาเก็บรักษาไว้ในอาหารวุ้นเอียง

- การได้รับสัมผัสสารอะคริฟลาวิน โดยใช้สารอะคริฟลาวิน ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที พบว่า เชื้อที่ผ่านการได้รับสัมผัสสารอะคริฟลาวินทั้งสองความเข้มข้น มีการรอดชีวิตของเชื้อจำนวน 3 ไอโซเลท คือ ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการรอดของเชื้อจำนวน 2 ไอโซเลท (ภาพที่ 4-5ก) และที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ต่อมิลลิลิตร มีการรอดของเชื้อจำนวน 1 ไอโซเลท (ภาพที่ 4-5ข) ซึ่งมีขนาดของโคโลนีใหญ่ที่สุด คือ 3.0 เซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4-5



ภาพที่ 4-5 ลักษณะของโคโลนีที่ได้รับสัมผัสสารอะคริฟลาวิน (ก) 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ข) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4-5 การรอดชีวิตของเชื้อที่ได้รับสัมผัสสารอะคริฟลาวิน

สารเคมี	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	การเจริญของเชื้อในเพลต	จำนวนโคโลนี	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร)
อะคริฟลาวิน (Acriflavin)	50	+	2	2.5 และ 2.8
	100	+	1	3.0

หมายเหตุ + เชื้อมีการเจริญ O ไม่มีการเจริญ

ดังนั้น จึงนำโคโลนีที่มีขนาดใหญ่ที่สุด คือ เชื้อที่ผ่านการได้รับสัมผัสสารอะคริฟลาวินที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเก็บรักษาไว้ในอาหารวุ้นเอียง

- การได้รับสัมผัสสาร 5-โบรโมยูราซิล โดยใช้สาร 5-โบรโมยูราซิลที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที พบว่า ไม่มีการรอดชีวิตของเชื้อเกิดขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4-6

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-6 การรอดชีวิตของเชื้อที่ได้รับสัมผัสสาร 5-โบรโมยูราซิล

สารเคมี	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	การเจริญของเชื้อในเพลต	จำนวนโคโลนี	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร)
5-โบรโมยูราซิล (5-Bromouracil)	50	O	-	-
	100	O	-	-

หมายเหตุ + เชื้อมีการเจริญ O ไม่มีการเจริญ

จากผลการศึกษาการเหนี่ยวนำเชื้อซ้ำด้วยวิธีต่าง ๆ เพื่อเพิ่มความสามารถในการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารของ Grothe et al. (1999) พบว่า เชื้อสามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงที่ระยะเวลาการเลี้ยงเดียวกัน คือ 48 ชั่วโมง โดยเชื้อสายพันธุ์เดิม (*A. latus* TISTR 1403/γ-2AA) ที่ผ่านการเหนี่ยวนำซ้ำโดยการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง ตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน จำนวน 2 ครั้ง และสารอะคริฟลาวิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงที่สุด คือ 5.45±0.14 และ 3.50±0.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-7 ดังนั้นจึงเลือกไปทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป ซึ่งจะใช้ชื่อเรียกว่า สายพันธุ์กลายซ้ำ ตลอดการทดลอง โดยทำการเพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์เดิมซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-7 การเปรียบเทียบการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำซ้ำ

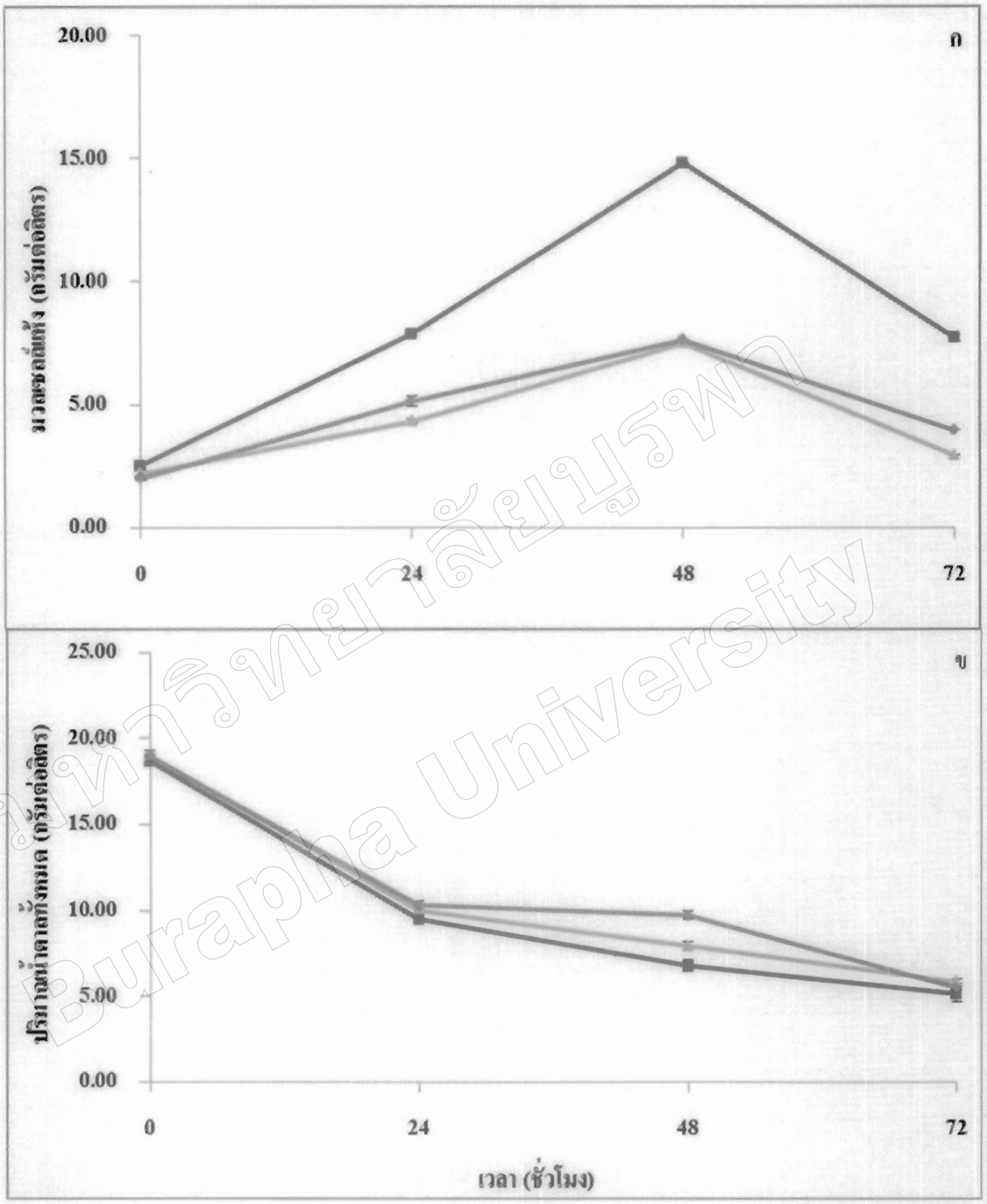
สายพันธุ์แบคทีเรีย	CDW (g/l)	PHB (g/l)	PHB (%)	อ้างอิง
A. latus TISTR 1403	1.50	0.60	40.00	Kaewjan et al. (2011)
A. latus TISTR 1403/γ-2AA	0.85	0.25	29.41	Kaewjan et al. (2011)
A. latus TISTR 1403/γ-2AA/ UV-2AA(1)	2.55^{a}±0.07	1.57^{a}±0.15	61.57	This study
A. latus TISTR 1403/γ-2AA/ UV-2AA(2)	3.10^{b}±0.10	1.97^{b}±0.12	63.55	This study
A. latus TISTR 1403/γ-2AA/ UV-2AA(2)/UV-Acriflavin	5.25^{c}±0.07	3.05^{c}±0.07	58.10	This study
A. latus TISTR 1403/γ-2AA/ UV-2AA(2)/UV-5-bromourasil	5.30^{c}±0.10	3.30^{d}±0.10	62.26	This study
A. latus TISTR 1403/γ-2AA/ UV-2AA(2)/Acriflavin	5.45^{c}±0.14	3.50^{c}±0.00	64.22	This study

2. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

2.1 ผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

จากการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำที่ได้จากการคัดเลือก ในสูตรอาหารสำหรับผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตทั้ง 3 สูตร ได้แก่ DSMZ catalogue (1993), El-Sayed et al. (2009) และ Savenkova et al. (1999) โดยมีการปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารทั้ง 3 สูตร มีแนวโน้มการเจริญในทิศทางเดียวกัน คือ มีระยะการเจริญแบบก้าวหน้า (log phase) อยู่ในช่วงก่อน 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง และมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงระยะการเลี้ยง 24 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4-6 และภาพที่ 4-7

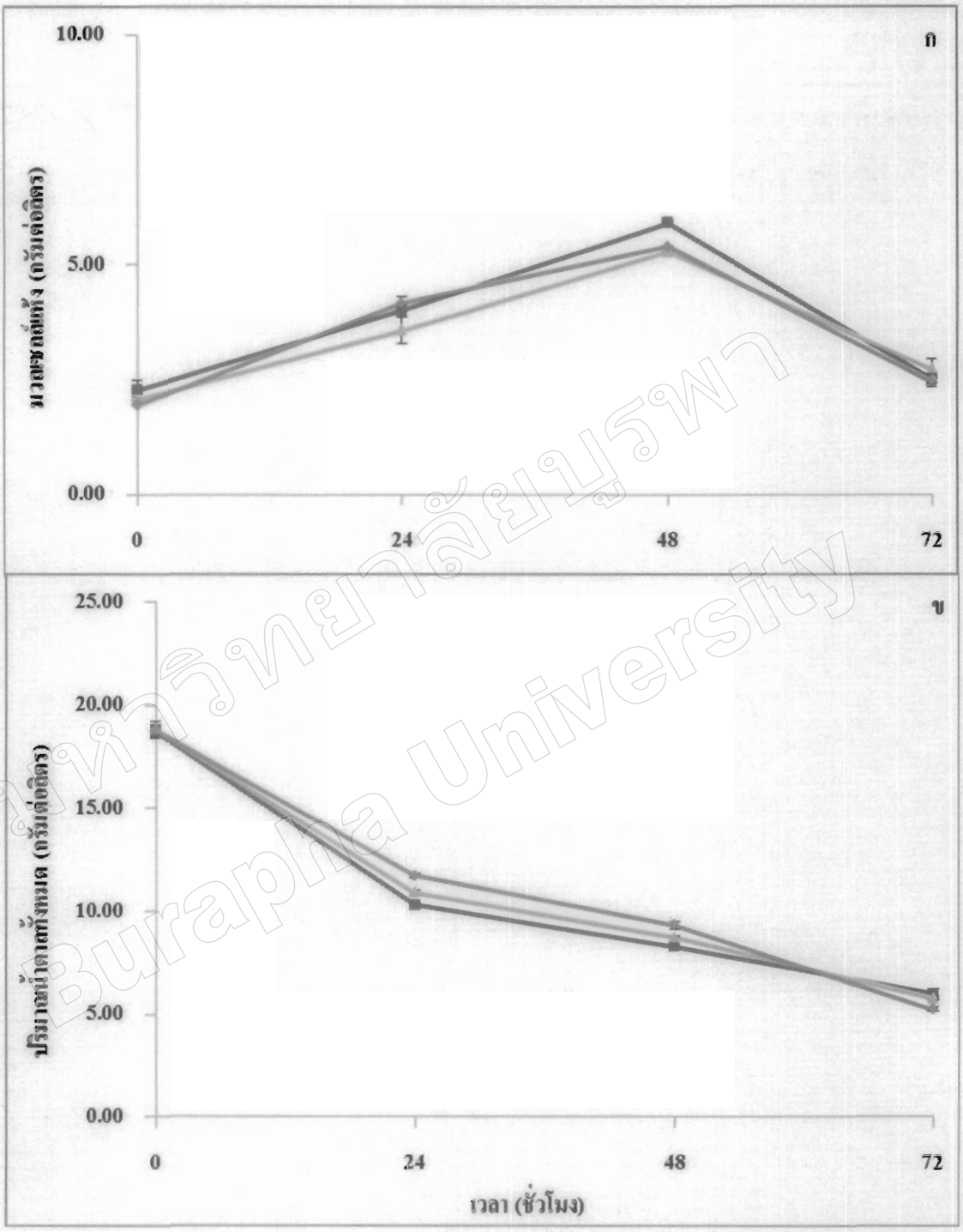
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-6 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน โดย

- DSMZ catalogue (1993)
- El-Sayed et al. (2009)
- Savenkova et al. (1999)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-7 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์เดิม ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน โดย

- DSMZ catalogue (1993)
- El-Sayed et al. (2009)
- Savenkova et al. (1999)

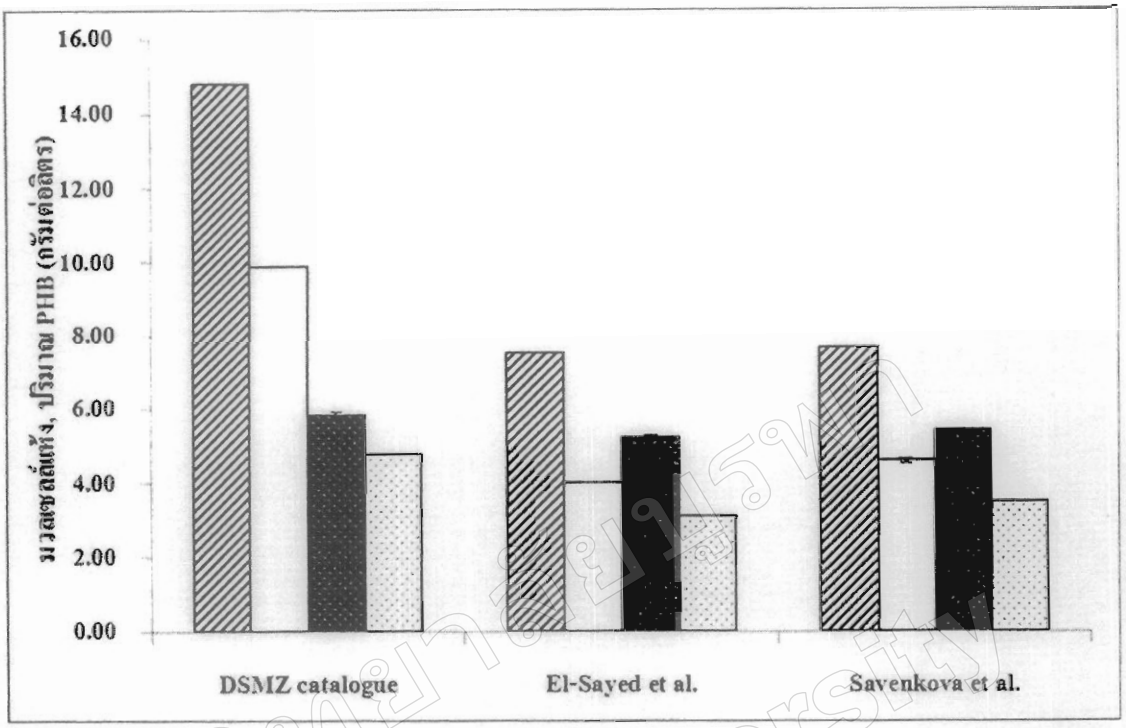
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อย่างไรก็ตามจากการเพาะเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่แตกต่างกันเพื่อตรวจสอบความสามารถในการเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต พบว่า มีค่าที่แตกต่างกัน กล่าวคือ เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร DSMZ catalogue (1993) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 14.80±0.01 กรัมต่อลิตร และผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ได้เท่ากับ 9.90±0.01 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 66.89 ของมวลเซลล์แห้ง รองลงมาคือ สูตรอาหาร Savenkova et al. (1999) และ El-Sayed et al. (2009) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน คือ มีค่ามวลเซลล์แห้งเท่ากับ 7.65±0.00 และ 7.52±0.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 4.60±0.07 และ 4.00±0.00 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 60.13 และ 53.19 ของมวลเซลล์แห้งตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์เดิม พบว่า สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร DSMZ catalogue (1999) เช่นเดียวกัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.90±0.06 และ 4.80±0.00 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 81.36 ของมวลเซลล์แห้ง รองลงมา คือ สูตรอาหาร Savenkova et al. (1999) และ El-Sayed et al. (2009) มีค่ามวลเซลล์แห้งเท่ากับ 5.40±0.01 และ 5.28±0.03 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต เท่ากับ 3.50±0.01 และ 3.10±0.01 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 64.81 และ 58.71 ของมวลเซลล์แห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-8 และนำมาเปรียบเทียบให้เห็นชัดเจนในรูปความสัมพันธ์ระหว่างมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ดังแสดงในภาพที่ 4-8

ตารางที่ 4-8 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารแตกต่างกัน

สูตรอาหาร	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		PHB (กรัมต่อลิตร)		PHB (ร้อยละ)	
	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ
DSMZ catalogue	5.90±0.06^{c}	14.80±0.01^{c}	4.80±0.00^{c}	9.90±0.01^{c}	81.36	66.89
El-Sayed et al.	5.28±0.03^{a}	7.52±0.01^{a}	3.10±0.01^{a}	4.00±0.00^{a}	58.71	53.19
Savenkova et al.	5.40±0.01^{b}	7.65±0.00^{b}	3.50±0.01^{b}	4.60±0.07^{b}	64.81	60.13

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพที่ 4-8 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHB สูงสุดในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน โดย ▨ มวลเซลล์แห้งของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ■ มวลเซลล์แห้งของเชื้อสายพันธุ์เดิม □ ปริมาณ PHB ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ⁘ ปริมาณ PHB ของเชื้อสายพันธุ์เดิม

ในการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) ค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) ดังแสดงในตารางที่ 4-9 พบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) ในสูตรอาหาร DSMZ catalogue (1993) และ Savenkova et al. (1999) มีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเท่ากับ 0.84 และ 0.80 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ และสูตรอาหาร El-Sayed et al. (2009) มีค่าเท่ากับ 0.66 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร DSMZ catalogue (1993) มีค่าสูงสุดเช่นเดียวกัน โดยมีค่าเท่ากับ 0.64 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ รองลงมา คือ สูตรอาหาร Savenkova et al. (1999) และ El-Sayed et al. (2009) มีค่าเท่ากับ 0.59 และ 0.54 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ และการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร DSMZ catalogue (1993) มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.68 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร รองลงมา คือ สูตรอาหาร Savenkova et al. (1999) และ El-Sayed et al. (2009) มีค่าเท่ากับ 0.37 และ 0.27 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม มีค่าสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร DSMZ catalogue (1993) เช่นเดียวกัน ซึ่งมีค่า

เท่ากับ 0.31 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร รองลงมา คือ สูตรอาหาร Savenkova et al. (1999) และ El-Sayed et al. (2009) มีค่าเท่ากับ 0.30 และ 0.21 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ (ตารางที่ 4-9)

สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร DSMZ catalogue (1993) มีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.07 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร รองลงมา คือ สูตรอาหาร Savenkova et al. (1999) และ El-Sayed et al. (2009) มีค่าเท่ากับ 0.63 และ 0.51 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ DSMZ catalogue (1993) และ Savenkova et al. (1999) มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหารเท่ากัน คือ 0.38 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร และสูตรอาหาร El-Sayed et al. (2009) มีค่าเท่ากับ 0.32 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร (ตารางที่ 4-9)

เมื่อคำนวณอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (Q_p) พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร DSMZ catalogue (1993) มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.21 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง รองลงมาคือ สูตรอาหาร Savenkova et al. (1999) และ El-Sayed et al. (2009) มีค่าเท่ากับ 0.10 และ 0.08 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม มีอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4-9) จะเห็นได้ว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ในสูตรอาหาร DSMZ catalogue (1993) เชื้อสามารถเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกสูตรอาหารนี้ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 4-9 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (Q_p) ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารแตกต่างกัน

สูตรอาหาร	Yp/x (g PHB/g cell)		Yp/s (g PHB/g substrate)		Yx/s (g cell/g substrate)		Q_p (g/l/h)	
	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ
DSMZ catalogue	0.64	0.84	0.31	0.68	0.38	1.07	0.10	0.21
El-Sayed et al.	0.54	0.66	0.21	0.27	0 32	0.51	0.06	0.08
Savenkova et al.	0.59	0.80	0.30	0.37	0.38	0.63	0.07	0.10

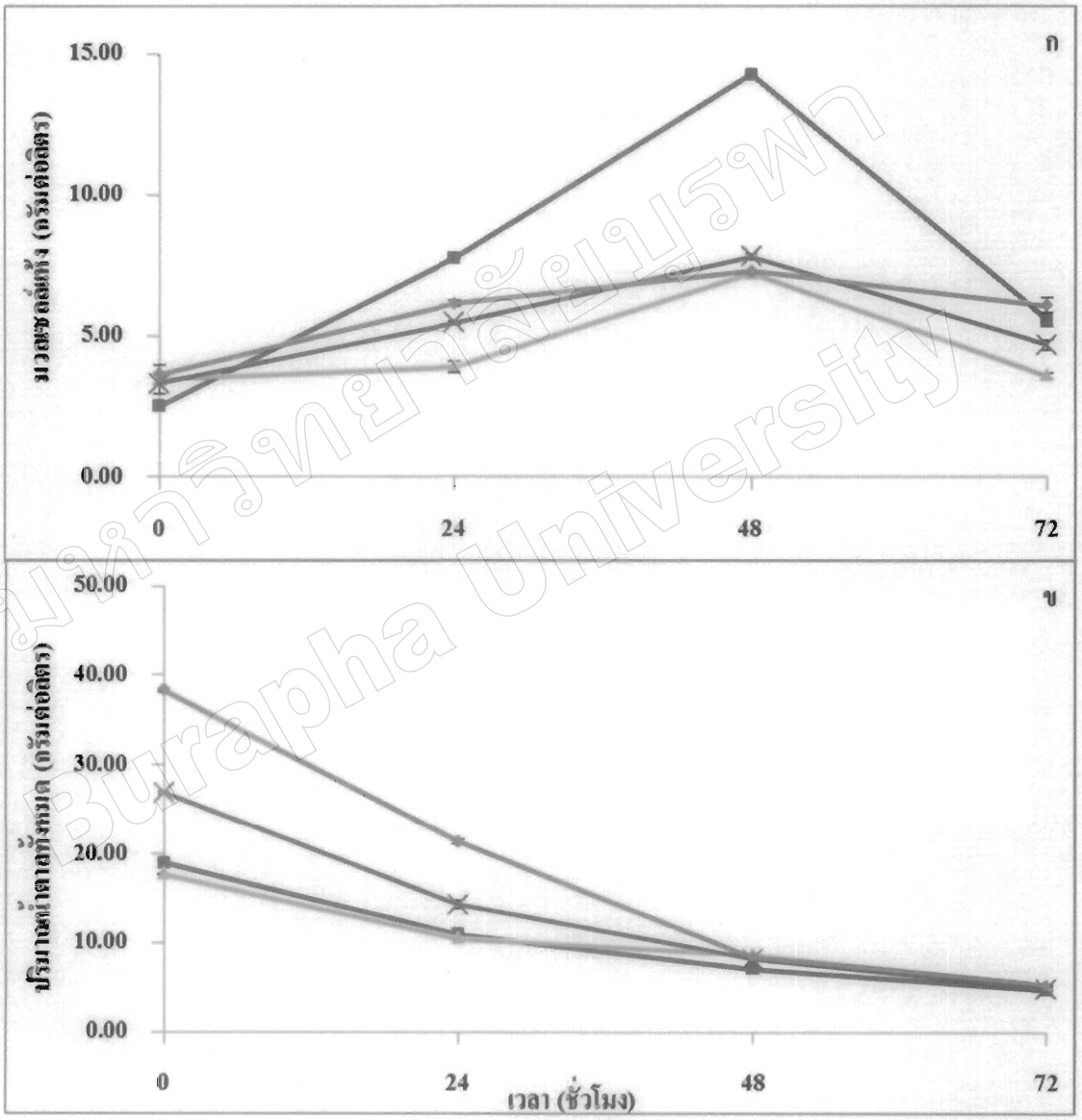
2.2 ผลของการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

จากเป้าหมายของการศึกษาที่ต้องการใช้สารอาหารราคาถูกเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์และนำไปสู่ระดับอุตสาหกรรม ในครั้งนี้ได้เลือกใช้กากน้ำตาลมาเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน เนื่องจากกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำตาล ซึ่งแบ่งได้ 2 ชนิด ตามวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำตาล ได้แก่ กากน้ำตาลอ้อย (cane molasses) และกากน้ำตาลจากหัวบีท (beet molasses) โดยองค์ประกอบของกากน้ำตาลอ้อยจะมีค่าสูงกว่ากากน้ำตาลจากหัวบีท ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส กลูโคส น้ำตาลอินเวิท ไนโตรเจน และมีสารประกอบอื่นปะปนอยู่ (Okafor , 2007)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำ ในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue ซึ่งใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมสูตร DSMZ catalogue (1993) ซึ่งใช้น้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีอัตราการเจริญระยะก้าวหน้าในช่วงก่อน 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงในทุกชุดการทดลอง โดยในอาหารชุดควบคุมมีการเจริญสูงสุด ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีแนวโน้มลดลงมากที่ระยะการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์เดิมทุกชุดการทดลอง มีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน โดยมีการเจริญระยะก้าวหน้าในช่วงก่อน 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงมากที่ระยะการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4-9 และภาพที่ 4-10

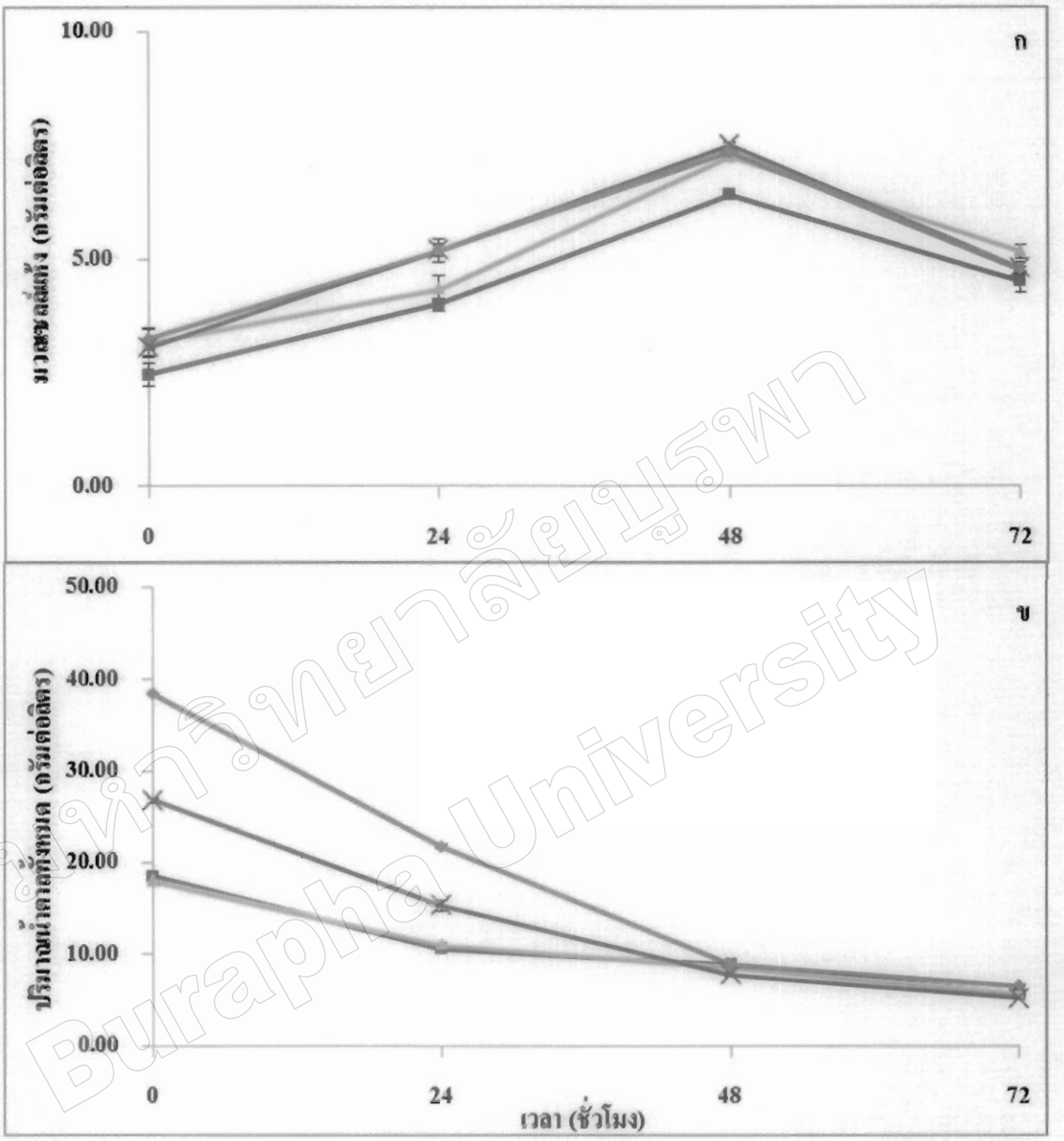
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดเท่ากับ 7.80±0.11 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง รองลงมา คือ ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 40 และ 20 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 7.30±0.01 และ 7.20±0.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารชุดควบคุมสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 14.25±0.01 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในทุกความเข้มข้น และสามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารชุดควบคุม คือ 9.15±0.01 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 64.21 ของมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตที่ผลิตได้ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลความเข้มข้น 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 5.27±0.12, 6.20±0.14 และ 5.54±0.05 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 73.19, 79.49 และ 75.89 ของมวลเซลล์แห้ง ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 7.50±0.06 และ 5.45±0.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 72.67 ของมวลเซลล์แห้ง รองลงมา คือ อาหารที่ใช้

กากน้ำตาลความเข้มข้น 40 และ 20 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 7.36±0.00 และ 7.25±0.01 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 5.30±0.09 และ 5.07±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 72.01 และ 69.93 ของมวลเซลล์แห้ง ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีค่าต่ำกว่าในอาหารชุดควบคุมคือ 78.13 ของมวลเซลล์แห้ง ดังแสดงในตารางที่ 4-10 และภาพที่ 4-11



ภาพที่ 4-9 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลแตกต่างกัน โดย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-10 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์เดิม ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลแตกต่างกัน โดย

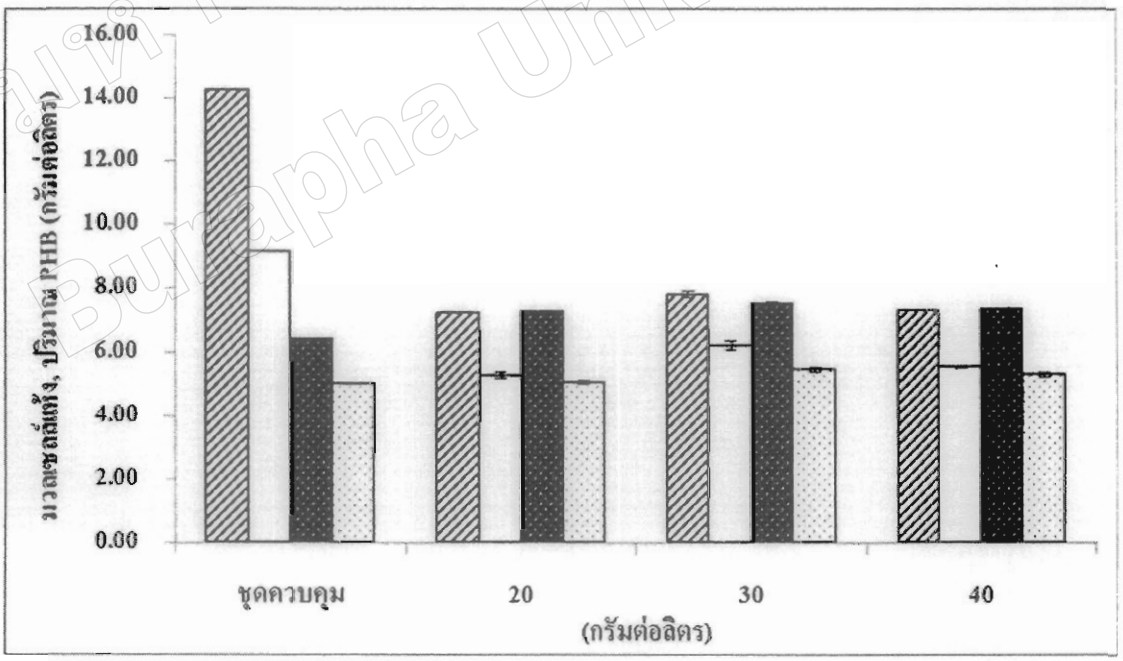
ชุดควบคุม — 30 กรัมต่อลิตร
20 กรัมต่อลิตร — 40 กรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-10 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลแตกต่างกัน

กากน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		PHB (กรัมต่อลิตร)		PHB (ร้อยละ)	
	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ
ชุดควบคุม	6.40±0.00^{a}	14.25±0.01^{d}	5.00±0.01^{a}	9.15±0.01^{d}	78.13	64.21
20	7.25±0.01^{b}	7.20±0.00^{a}	5.07±0.06^{b}	5.27±0.12^{a}	69.93	73.19
30	7.50±0.06^{d}	7.80±0.11^{c}	5.45±0.07^{d}	6.20±0.14^{c}	72.67	79.49
40	7.36±0.00^{c}	7.30±0.01^{b}	5.30±0.09^{c}	5.54±0.05^{b}	72.01	75.89

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพที่ 4-11 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHB สูงสุดที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลแตกต่างกัน โดยที่

มวลเซลล์แห้งของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มวลเซลล์แห้งของเชื้อสายพันธุ์เดิม

ปริมาณ PHB ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ปริมาณ PHB ของเชื้อสายพันธุ์เดิม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากปริมาณของมวลเซลล์แห้งและพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตที่เชื้อทั้งสองสายพันธุ์ผลิตได้นำมาคิดเป็นค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) โดยเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.85 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ส่วนในอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 40 และ 20 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.83 และ 0.72 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่ามีค่าต่ำกว่า โดยชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 1.08 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ และเชื้อสายพันธุ์เดิม มีค่าสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.70 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ รองลงมา คือ ความเข้มข้น 20 และ 40 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.65 และ 0.60 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุม มีค่าเท่ากับ 0.61 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ดังแสดงในตารางที่ 4-11

สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.33 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร ส่วนในอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 20 และ 40 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.29 และ 0.21 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ ซึ่งทุกความเข้มข้นของกากน้ำตาลมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุม คือ 0.59 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร และเชื้อสายพันธุ์เดิม มีค่าสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.26 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร และในอาหารที่ใช้กากน้ำตาล 20 และ 40 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.23 และ 0.16 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ (ตารางที่ 4-11)

ส่วนค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.42 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร รองลงมา คือ ความเข้มข้น 20 และ 40 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.33 และ 0.23 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร ส่วนชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.98 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร ซึ่งมีค่าสูงกว่าการเลี้ยงในกากน้ำตาลทุกความเข้มข้น และเชื้อสายพันธุ์เดิมมีค่าเท่ากับ 0.28, 0.32 และ 0.21 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร ในอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากการคำนวณอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (Q_p) พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.13 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง รองลงมา คือ ความเข้มข้น 40 และ 20 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.12 และ 0.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.20 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม

มีอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ใกล้เคียงกันในทุกชุดการทดลอง จากผลการศึกษา พบว่า การเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูง ดังนั้นจึงเลือกไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

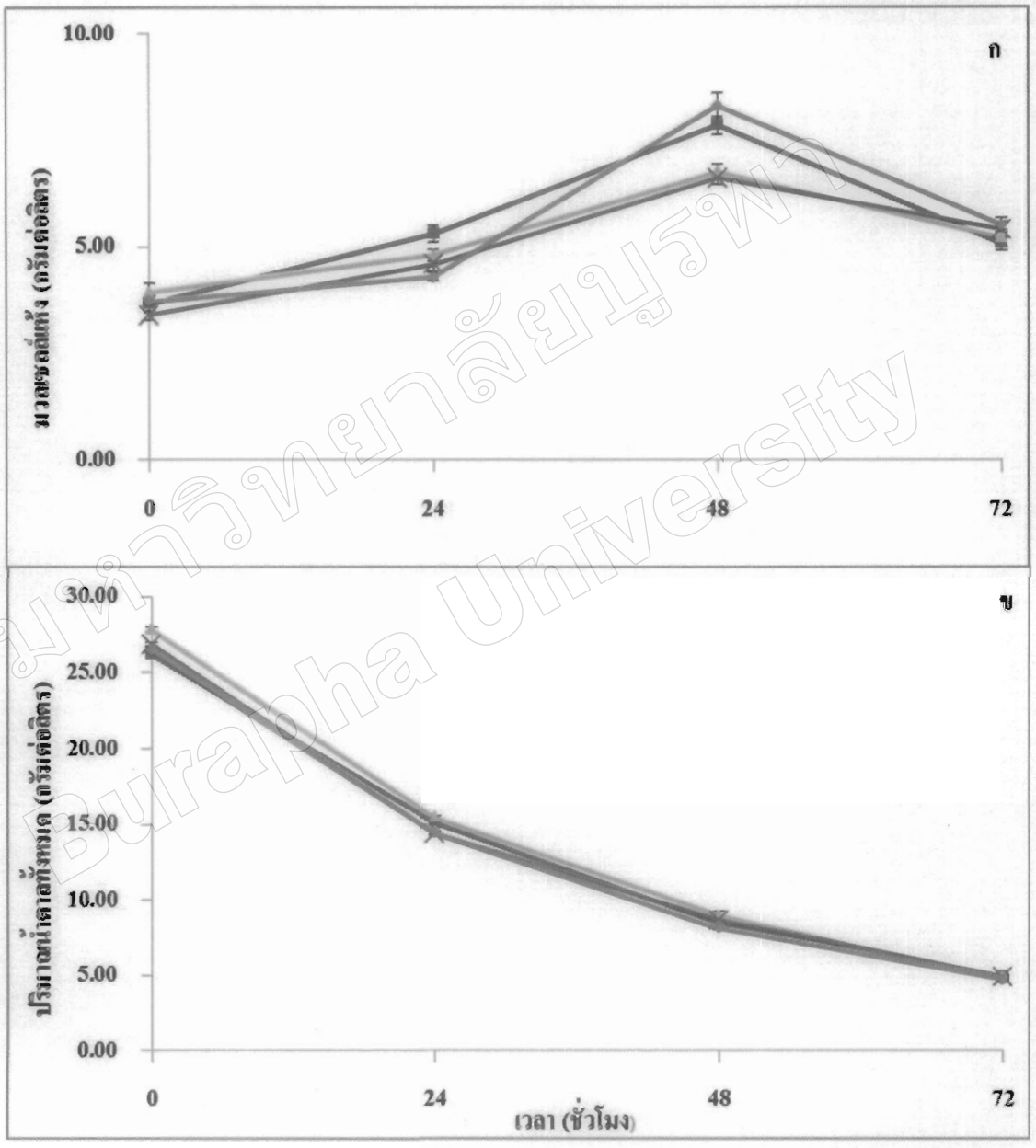
ตารางที่ 4-11 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (*Qp*) ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความ เข้มข้นของกากน้ำตาลแตกต่างกัน

กากน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	Yp/x (g PHB/g cell)		Yp/s (g PHB/g substrate)		Yx/s (g cell/g substrate)		*Qp* (g/l/h)	
	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ
ชุดควบคุม	0.61	1.08	0.42	0.59	0.39	0.98	0.10	0.20
20	0.65	0.72	0.23	0.29	0.28	0.33	0.10	0.11
30	0.70	0.85	0.26	0.33	0.32	0.42	0.11	0.13
40	0.60	0.83	0.16	0.21	0.21	0.23	0.11	0.12

2.3 ผลของการใช้น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ในการศึกษาความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำ โดยการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue (1993) ซึ่งปรับความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดที่แตกต่างกัน คือ 2, 3 และ 4 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการใช้กากน้ำตาลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน เปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้กากน้ำตาลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีอัตราการเจริญระยะก้าวหน้าในช่วงก่อน 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ในทุกชุดการทดลอง โดยในอาหารชุดควบคุมมีการเจริญสูงสุด และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า เมื่อเชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลจะลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ โดยมีค่าลดลงมากที่ระยะการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิมมี

อัตราการเจริญสูงสุดในอาหารชุดควบคุมเช่นเดียวกัน และพบว่าในทุกชุดการทดลองมีการเจริญระยะก้าวหน้าในช่วงก่อน 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยลดลงมากที่ระยะการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4-12 และภาพที่ 4-13

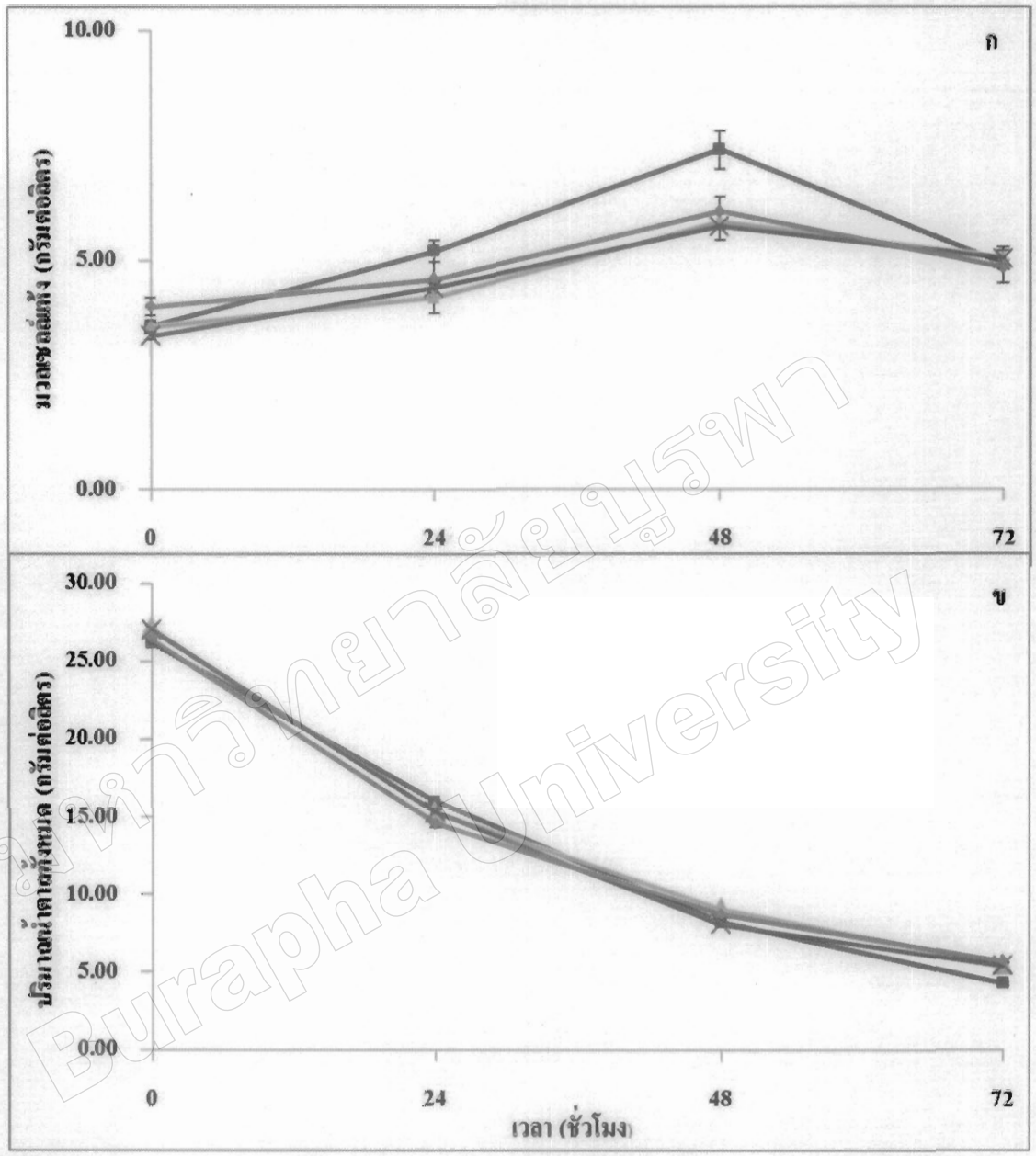


ภาพที่ 4-12 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดแตกต่างกัน โดย

ชุดควบคุม — 3 กรัมต่อลิตร

2 กรัมต่อลิตร — 4 กรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-13 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์เดิม ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดแตกต่างกัน โดย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

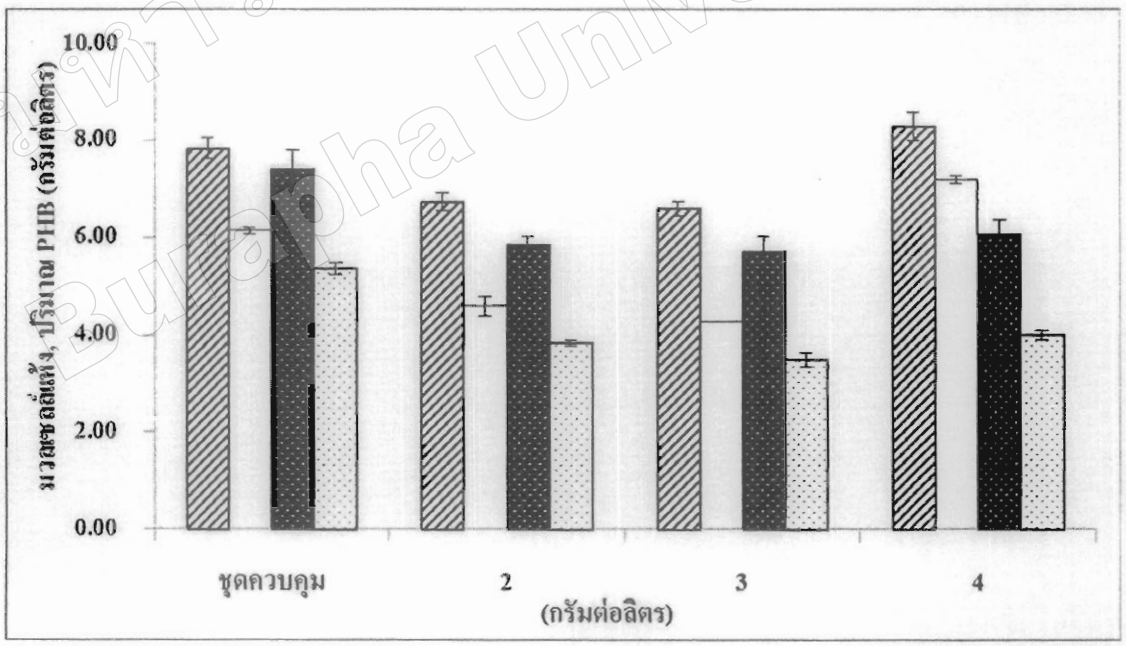
จากการเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด 8.30±0.30 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4-12 และภาพที่ 4-14 รองลงมา คือ อาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 2 และ 3 กรัมต่อลิตร ให้มวลเซลล์แห้งเท่ากับ 6.75±0.18 และ 6.60±0.14 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในชุดควบคุมสามารถผลิตได้ 7.85±0.21 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต พบว่า เชื้อสามารถผลิตได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 7.20±0.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 86.75 ของมวลเซลล์แห้ง รองลงมา คือ อาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 2 และ 3 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 4.60±0.20 และ 4.30±0.00 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 68.15 และ 65.15 ของมวลเซลล์แห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 4-12 และภาพที่ 4-14) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่า ชุดควบคุมสามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 6.15±0.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 78.34 ของมวลเซลล์แห้ง ส่วนการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดเท่ากับ 6.07±0.03 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต เท่ากับ 4.00±0.10 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 65.90 ของมวลเซลล์แห้ง รองลงมา คือ อาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 2 และ 3 กรัมต่อลิตร โดยสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 5.85±0.18 และ 5.73±0.29 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ได้เท่ากับ 3.85±0.07 และ 3.50±0.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 65.81 และ 61.08 ของมวลเซลล์แห้ง ตามลำดับ และพบว่าในทุกชุดการทดลองมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุม (ตารางที่ 4-12 และภาพที่ 4-14)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-12 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดแตกต่างกัน

น้ำแช่ข้าวโพด (กรัมต่อลิตร)	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		PHB (กรัมต่อลิตร)		PHB (ร้อยละ)	
	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ
ชุดควบคุม	7.40 ± 0.42^{d}	7.85 ± 0.21^{c}	5.37 ± 0.12^{d}	6.15 ± 0.07^{c}	72.57	78.34
2	5.85 ± 0.18^{b}	6.75 ± 0.18^{b}	3.85 ± 0.07^{b}	4.60 ± 0.20^{b}	65.81	68.15
3	5.73 ± 0.29^{c}	6.60 ± 0.14^{a}	3.50 ± 0.14^{c}	4.30 ± 0.00^{a}	61.08	65.15
4	6.07 ± 0.03^{a}	8.30 ± 0.30^{d}	4.00 ± 0.10^{a}	7.20 ± 0.07^{d}	65.90	86.75

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพที่ 4-14 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHB สูงสุดที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดแตกต่างกัน โดยที่
▨ มวลเซลล์แห้งของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ■ มวลเซลล์แห้งของเชื้อสายพันธุ์เดิม
□ ปริมาณ PHB ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ⁘ ปริมาณ PHB ของเชื้อสายพันธุ์เดิม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากการศึกษา พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สูงสุด เท่ากับ 1.06 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง ส่วนในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 2 และ 3 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.68 และ 0.47 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-13 โดยในชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.92 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ และเชื้อสายพันธุ์เดิม พบว่า มีค่าสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในชุดควบคุม คือ 0.75 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ส่วนในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4, 2 และ 3 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.68, 0.50 และ 0.44 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ

สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร ให้ค่าสูงสุดเท่ากับ 0.37 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร รองลงมา คือ อาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 3 และ 2 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.18 และ 0.17 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร ส่วนชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.31 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร และเชื้อสายพันธุ์เดิมจะมีค่าสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.18 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร และในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 และ 3 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.17 และ 0.16 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร โดยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่ามีค่าต่ำกว่า (ตารางที่ 4-13)

สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yp/s) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร มีค่าสูงสุด คือ 0.35 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร ส่วนในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 3 และ 2 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.28 และ 0.25 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ โดยในชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.42 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร และเชื้อสายพันธุ์เดิม มีค่าสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.32 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร รองลงมา คือ ในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 3, 2 และ 4 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.25, 0.23 และ 0.20 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ

และเมื่อคำนวณอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (Q_p) พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.15 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนในชุดการทดลองอื่นมีค่าใกล้เคียงกัน และเชื้อสายพันธุ์เดิมมีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารชุดควบคุม ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดมีค่าใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4-13) จากผลการศึกษา พบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองสาย

พันธุ์ในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน เชื้อสามารถเจริญและมีการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูง ดังนั้นจึงเลือกไปใช้ในการศึกษาต่อไป

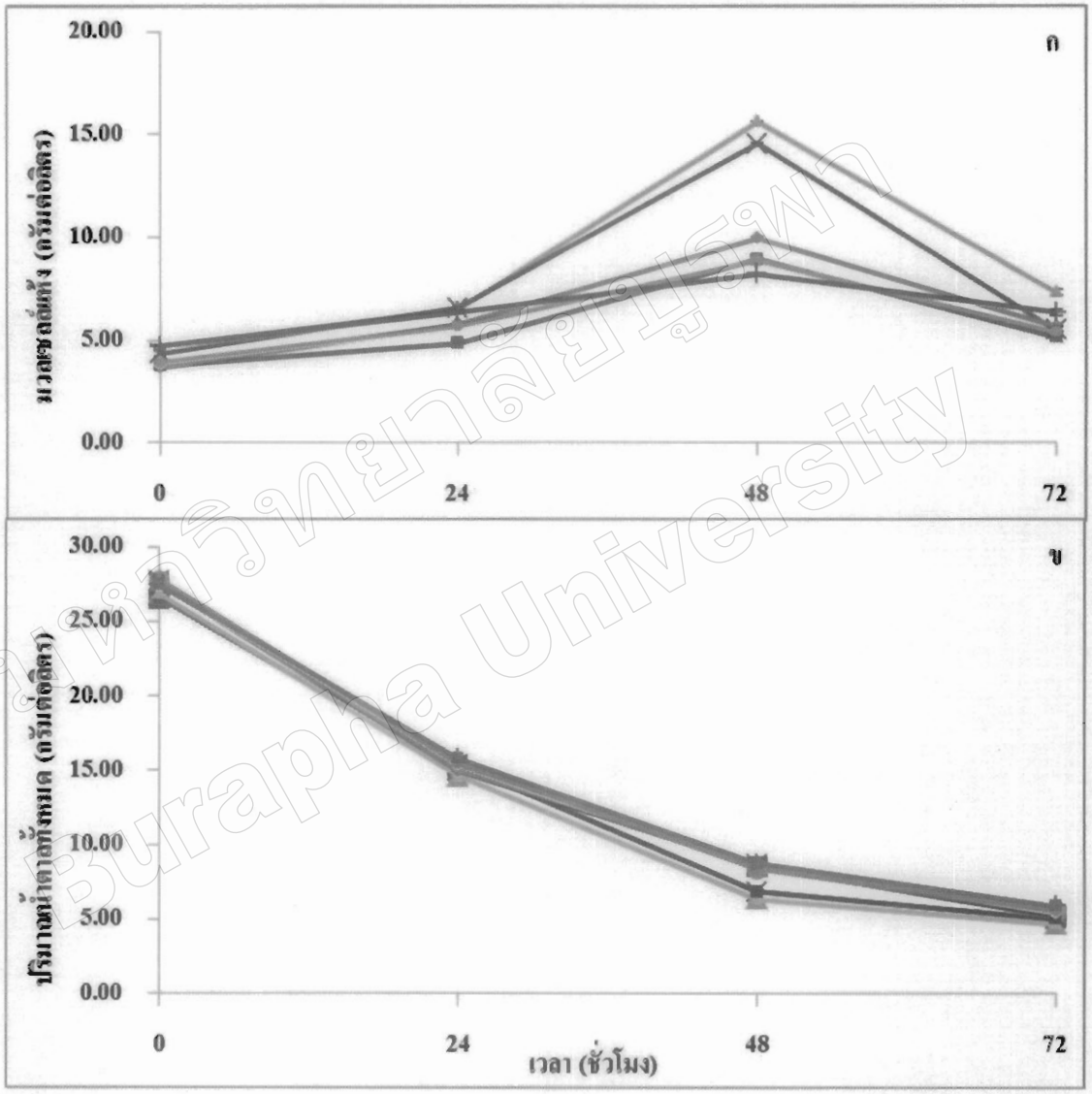
ตารางที่ 4-13 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (Q*p*) ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดแตกต่างกัน

น้ำแช่ข้าวโพด (กรัมต่อลิตร)	Yp/x (g PHB/g cell)		Yp/s (g PHB/g substrate)		Yx/s (g cell/g substrate)		Q*p* (g/l/h)	
	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ
ชุดควบคุม	0.75	0.92	0.26	0.31	0.22	0.42	0.11	0.13
2	0.50	0.68	0.18	0.17	0.23	0.25	0.08	0.10
3	0.44	0.47	0.16	0.18	0.25	0.28	0.07	0.09
4	0.68	1.06	0.17	0.37	0.20	0.35	0.08	0.15

2.4 ผลของความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

ในการศึกษาความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำ ด้วยการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue (1993) โดยปรับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร ร่วมกับกากน้ำตาลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนทดแทน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 2.3 กรัมต่อลิตร กากน้ำตาลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนทดแทน ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง พบว่า เชื้อสามารถเจริญได้สูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งการเจริญมีแนวโน้มในทิศทางเดียวกัน คือ มีระยะการ

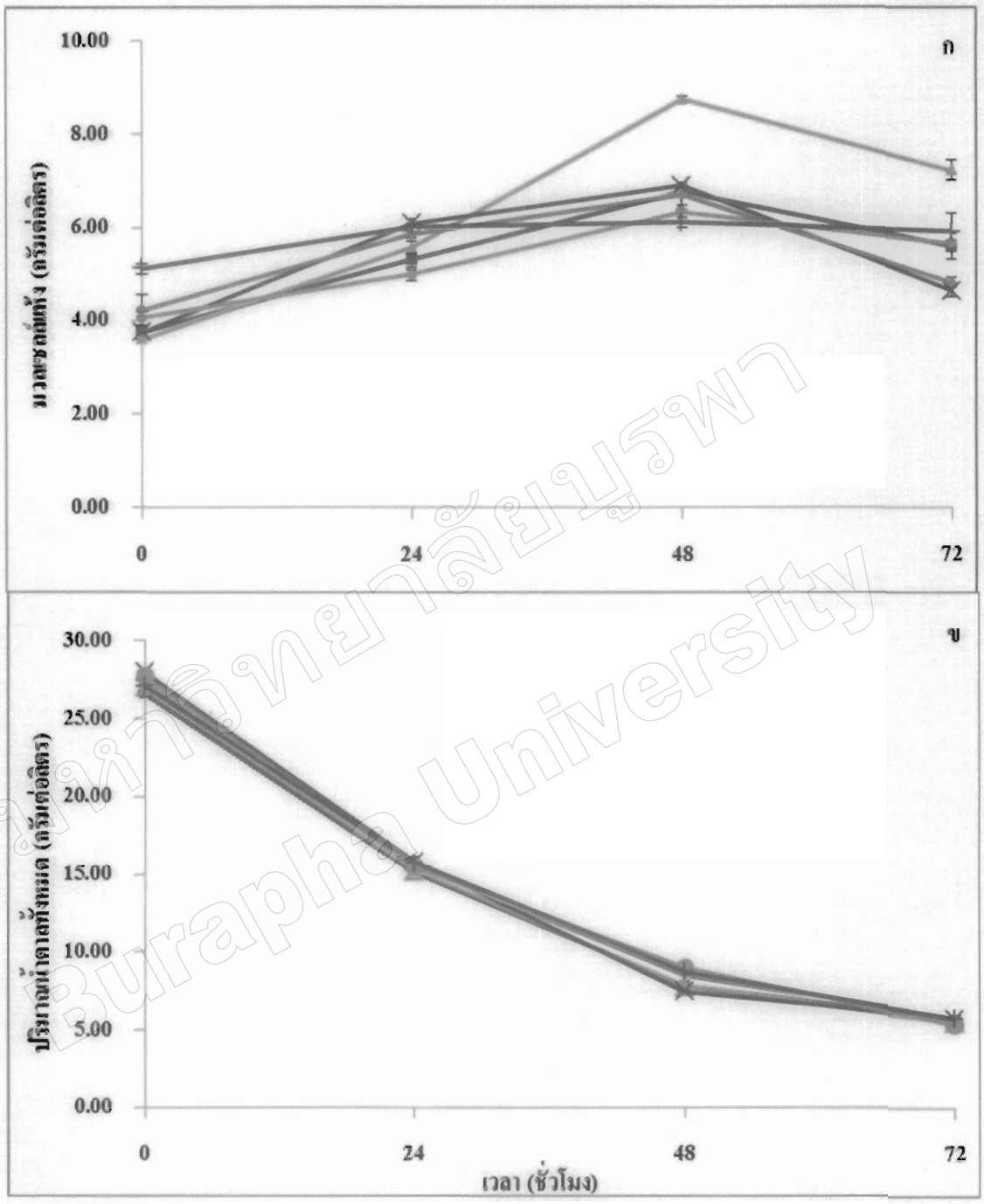
เจริญก้าวหน้าในช่วงก่อน 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีการลดลงอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งลดลงมากที่ระยะการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4-15 และภาพที่ 4-16



ภาพที่ 4-15 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตแตกต่างกัน โดย

- ชุดควบคุม
- 2.5 กรัมต่อลิตร
- 3.0 กรัมต่อลิตร
- 3.5 กรัมต่อลิตร
- 4.0 กรัมต่อลิตร
- 5.0 กรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-16 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์เดิม ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตแตกต่างกัน โดย

- ชุดควบคุม
- 2.5 กรัมต่อลิตร
- 3.0 กรัมต่อลิตร
- 3.5 กรัมต่อลิตร
- 4.0 กรัมต่อลิตร
- 5.0 กรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

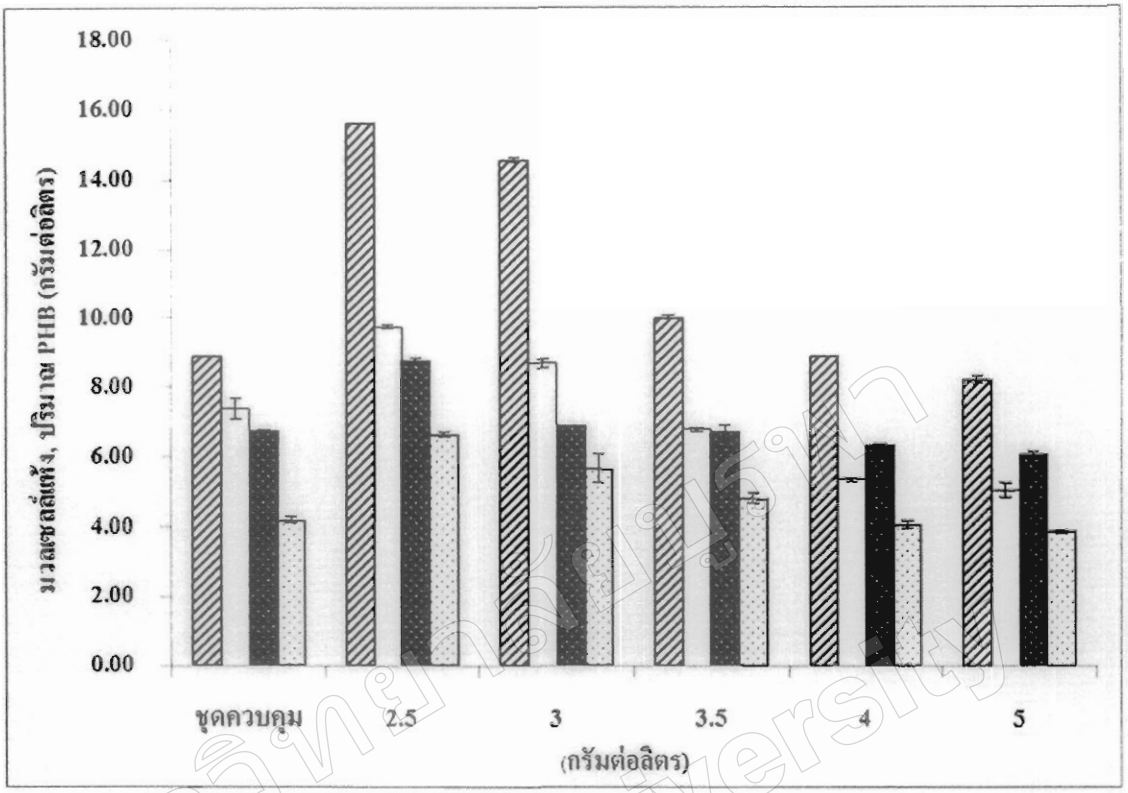
จากการเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดเท่ากับ 15.62±0.00 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4-14 และภาพที่ 4-17 รองลงมา คือ อาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 3.0, 3.5, 4.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร ผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 14.55±0.07, 9.99±0.06, 8.85±0.01 และ 8.20±0.10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และชุดควบคุมผลิตได้ 8.90±0.02 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต พบว่า เชื้อสามารถผลิตได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร ผลิตได้ 9.73±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 62.29 ของมวลเซลล์แห้ง รองลงมา คือ อาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 3.0, 3.5, 4.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร ผลิตได้ 8.67±0.12, 6.77±0.06, 5.37±0.06 และ 5.05±0.21 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 59.59, 67.77, 60.68 และ 61.59 ของมวลเซลล์แห้ง (ตารางที่ 4-14 และภาพที่ 4-17) ส่วนชุดควบคุมสามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้ 7.37±0.30 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 82.80 ของมวลเซลล์แห้ง และการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดเท่ากับ 8.75±0.07 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต เท่ากับ 6.65±0.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 76.00 ของมวลเซลล์แห้ง ซึ่งสูงกว่าในชุดควบคุม ส่วนในอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 3.0, 3.5, 4.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 6.90±0.07, 6.70±0.21, 6.33±0.05 และ 6.10±0.10 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ได้เท่ากับ 5.67±0.40, 4.83±0.15, 4.07±0.12 และ 3.87±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 82.17, 72.09, 64.30 และ 63.44 ของมวลเซลล์แห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 4-14 และภาพที่ 4-17)

ตารางที่ 4-14 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตแตกต่างกัน

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (กรัมต่อลิตร)	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		PHB (กรัมต่อลิตร)		PHB (ร้อยละ)	
	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ
ชุดควบคุม	6.75±0.04^{d}	8.90±0.02^{c}	4.20±0.10^{c}	7.37±0.30^{d}	62.22	82.80
2.5	8.75±0.07^{f}	15.62±0.00^{f}	6.65±0.07^{f}	9.73±0.06^{f}	76.00	62.29
3.0	6.90±0.07^{e}	14.55±0.07^{e}	5.67±0.40^{e}	8.67±0.12^{e}	82.17	59.59
3.5	6.70±0.21^{b}	9.99±0.06^{d}	4.83±0.15^{d}	6.77±0.06^{c}	72.09	67.77
4.0	6.33±0.05^{c}	8.85±0.01^{b}	4.07±0.12^{b}	5.37±0.06^{b}	64.30	60.68
5.0	6.10±0.10^{a}	8.20±0.10^{a}	3.87±0.06^{a}	5.05±0.21^{a}	63.44	61.59

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-17 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHB สูงสุดที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตแตกต่างกัน โดยที่ มวลเซลล์แห้งของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มวลเซลล์แห้งของเชื้อสายพันธุ์เดิม ปริมาณ PHB ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ปริมาณ PHB ของเชื้อสายพันธุ์เดิม

จากการคำนวณค่าจลนพลศาสตร์ของการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำในอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สูงสุดเท่ากับ 0.98 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง รองลงมา คือ ในอาหารที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 3.0, 3.5, 4.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.78, 0.75, 0.74 และ 0.67 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ ส่วนในชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.86 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ดังแสดงในตารางที่ 4-15 และเชื้อสายพันธุ์เดิม มีค่าสูงสุดในอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกัน โดยมีค่าเท่ากับ 0.63 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ และในอาหารที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 3.0, 3.5, 4.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.58, 0.55, 0.52 และ 0.48 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ส่วนในชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.51 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

เท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร มีค่าสูงสุด คือ 0.39 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร รองลงมา คือ อาหารที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 3.0, 3.5, 4.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.33, 0.31, 0.25 และ 0.21 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ โดยในชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.34 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร และเชื้อสายพันธุ์เดิม มีค่าสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.30 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร รองลงมา คือ อาหารที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 3.0, 3.5, 4.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.22, 0.19, 0.19 และ 0.15 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.17 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร

สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.5, 3, 3.5, 4 และ 5 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.53, 0.48, 0.43, 0.35 และ 0.29 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ และชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.38 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร (ตารางที่ 4-15) ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิมที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.37, 0.25, 0.24, 0.22 และ 0.16 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.27 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร

และเมื่อคำนวณอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (Q_p) พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.5, 3, 3.5, 4 และ 5 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.20, 0.18, 0.14, 0.11 และ 0.10 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.15 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4-15) ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิมที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.14, 0.12, 0.10, 0.08 และ 0.08 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

ตารางที่ 4-15 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (*Qp*) ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตแตกต่างกัน

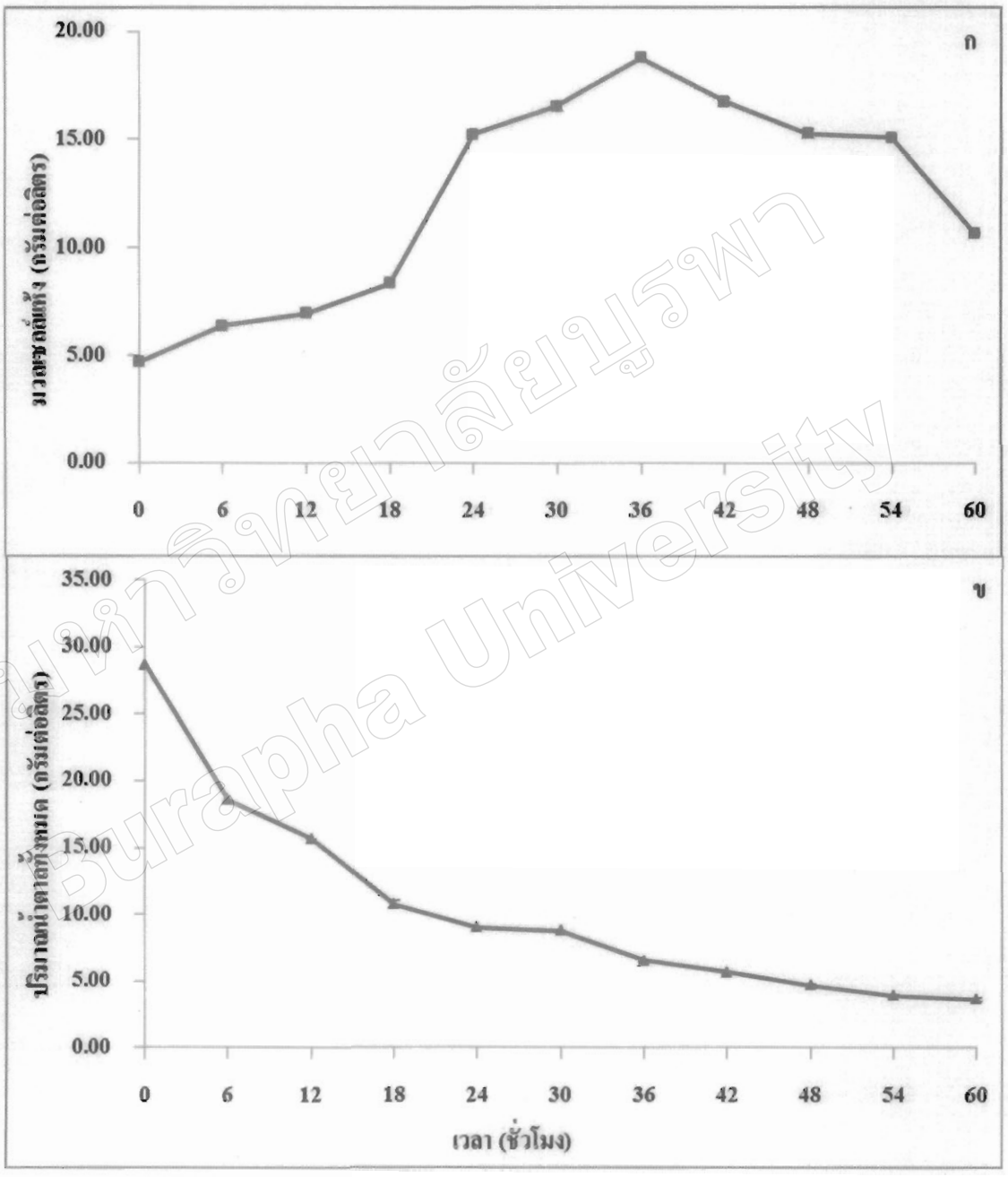
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจน (กรัมต่อลิตร)	Yp/x (g PHB/g cell)		Yp/s (g PHB/g substrate)		Yx/s (g cell/g substrate)		*Qp* (g/l/h)	
	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ
ชุดควบคุม	0.51	0.86	0.17	0.34	0.27	0.38	0.09	0.15
2.5	0.63	0.98	0.30	0.39	0.37	0.53	0.14	0.20
3	0.58	0.78	0.22	0.33	0.25	0.48	0.12	0.18
3.5	0.55	0.75	0.19	0.31	0.24	0.43	0.10	0.14
4	0.52	0.74	0.19	0.25	0.22	0.35	0.08	0.11
5	0.48	0.67	0.15	0.21	0.16	0.29	0.08	0.10

3. ผลของการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงสู่ระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

3.1 ผลของการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch Culture)

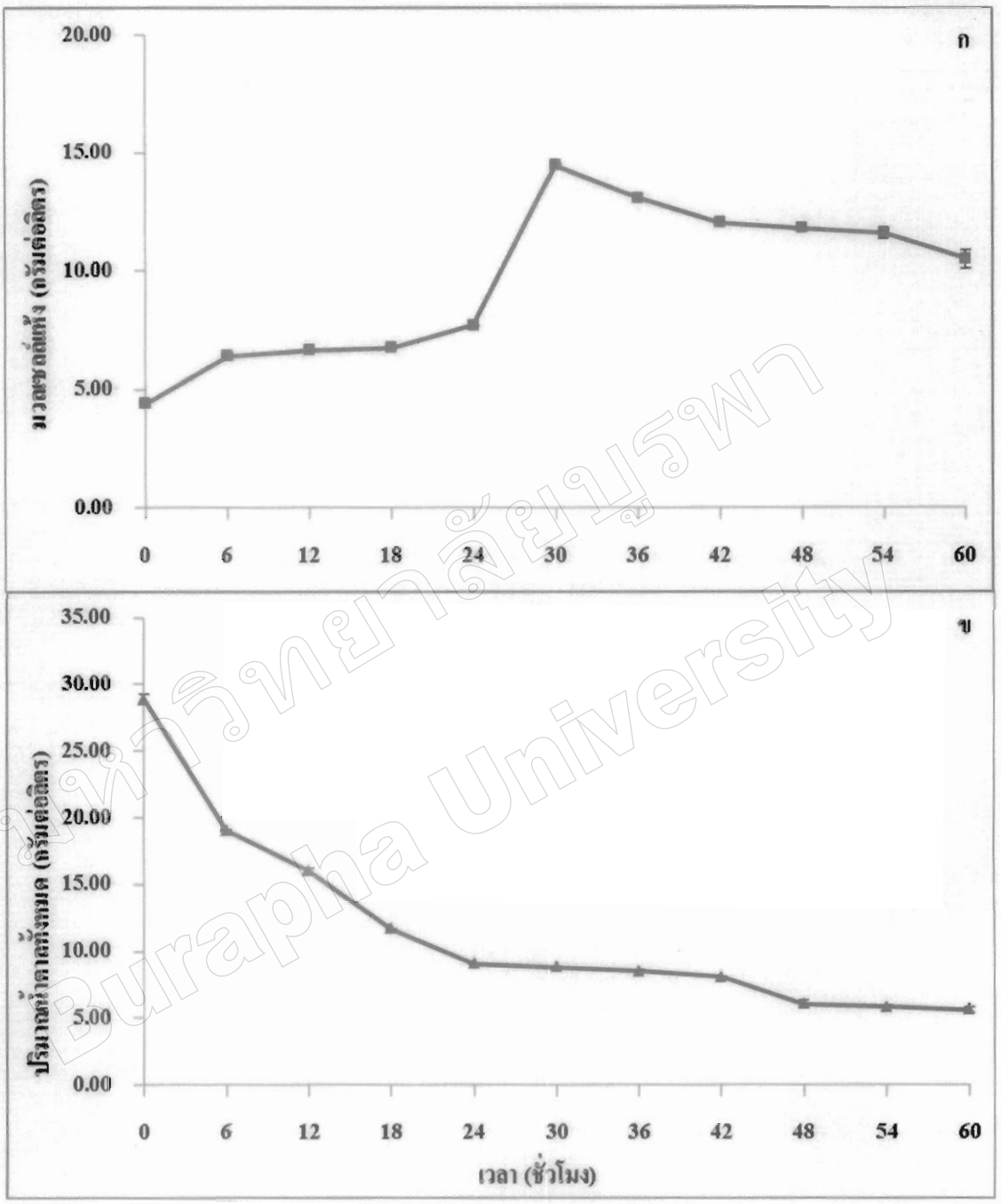
จากการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) ขนาด 5 ลิตร โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 เติมลงในอาหารปริมาตร 3 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราเร็วใบพัดอยู่ในช่วง 100-200 รอบต่อนาที กำหนดอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm และค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 นอร์มอล ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 60 ชั่วโมง พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 18-30 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญจึงเริ่มคงที่ ดังแสดงในภาพที่ 4-18 ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีการลดลงตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ และเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงที่ระยะเวลา 60 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดคงเหลือภายในถังเท่ากับ 3.64±0.03 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4-18) ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม มีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 18-30 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญจึงเริ่มคงที่ ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีการลดลง

ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง โดยเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดคงเหลือเท่ากับ 5.60±0.25 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4-19



ภาพที่ 4-18 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-19 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์เดิม ที่เพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

จากการศึกษาการผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ สามารถผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 18.73±0.06 และ 11.83±0.29 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 63.16 ของมวลเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 36 ชั่วโมง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม สามารถ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 14.45±0.07 และ 8.70±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 60.21 ของมวลเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 30 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4-16

ตารางที่ 4-16 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

สายพันธุ์แบคทีเรีย	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PHB (กรัมต่อลิตร)	PHB (ร้อยละ)
สายพันธุ์เดิม	14.45±0.07[a]	8.70±0.06[b]	60.21
สายพันธุ์กลายซ้ำ	18.73±0.06[c]	11.83±0.29[d]	63.16

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีค่าเท่ากับ 0.78 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) เท่ากับ 0.37 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) เท่ากับ 0.43 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (Q_p) เท่ากับ 0.33 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 36 ชั่วโมง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) เท่ากับ 0.69 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) เท่ากับ 0.29 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) เท่ากับ 0.40 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (Q_p) เท่ากับ 0.29 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงที่ระยะเวลาการเลี้ยง 30 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4-17

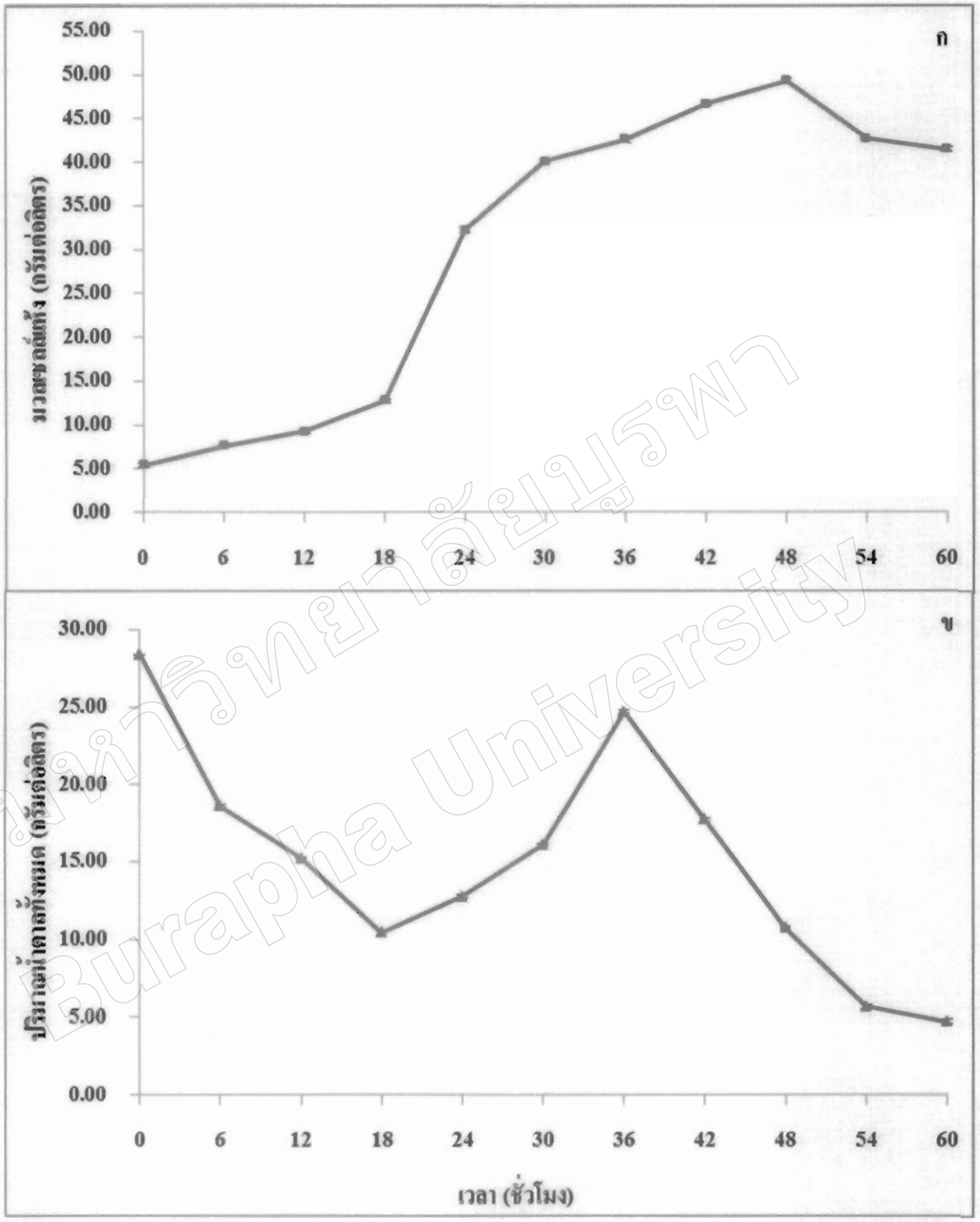
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-17 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (*Qp*) ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

สายพันธุ์แบคทีเรีย	Yp/x (g PHB/g Cell)	Yp/s (g PHB/g substrate)	Yx/s (g Cell/g substrate)	*Qp* (g/l/h)
สายพันธุ์เดิม	0.69	0.29	0.40	0.29
สายพันธุ์กลายซ้ำ	0.78	0.37	0.43	0.33
ผลได้ทางทฤษฎี (theoretical yield)	~0.8-0.9	0.38	~0.45	

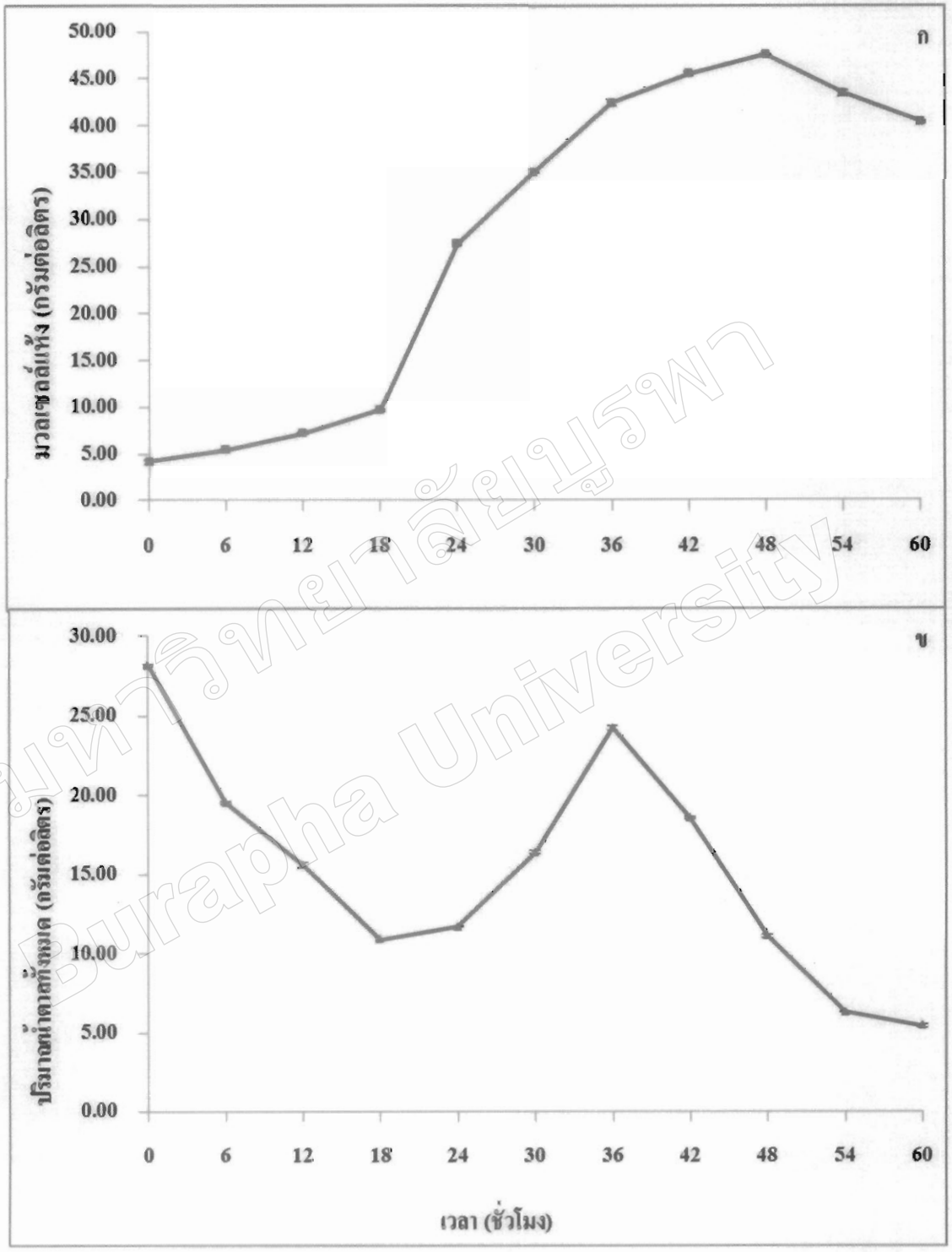
3.2 ผลของการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ (Fed-Batch Culture)

การผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ จะทำการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงแบบกะ แต่จะใช้ปริมาตรในการผลิตเริ่มต้น (Initial Volumn) 1 ลิตร เติมหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ลงในอาหาร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราเร็วใบพัดอยู่ในช่วง 100-200 รอบต่อนาที กำหนดอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm และควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 ทำการเพาะเลี้ยงแบบกะจากชั่วโมงที่ 0-18 จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ โดยเติมสารอาหาร (feed medium) ปริมาตร 2 ลิตร ที่อัตราการเติม (feed rate) 79 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จากชั่วโมงที่ 18 ถึง 42 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้มีปริมาตรในการหมักทั้งหมดเท่ากับ 3 ลิตร และทำการเพาะเลี้ยงจนครบ 60 ชั่วโมง พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18-42 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญจึงเริ่มคงที่ ดังแสดงในภาพที่ 4-20 ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง พบว่า มีปริมาณคงเหลือภายในถังหมักเท่ากับ 4.72±0.14 กรัมต่อลิตร ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม มีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18-42 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญจึงเริ่มคงที่เช่นเดียวกับเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดคงเหลือภายในถังหมักเท่ากับ 5.43±0.12 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในภาพที่ 4-21



ภาพที่ 4-20 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-21 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์เดิม ที่เพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 49.30±0.06 และ 32.20±0.10 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 65.31 ของมวลเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณ พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 47.53±0.06 และ 29.43±0.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 61.91 ของมวลเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4-18

ตารางที่ 4-18 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

สายพันธุ์แบคทีเรีย	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PHB (กรัมต่อลิตร)	PHB (ร้อยละ)
สายพันธุ์เดิม	47.53±0.06[a]	29.43±0.15[c]	61.91
สายพันธุ์กลายซ้ำ	49.30±0.20[b]	32.20±0.10[c]	65.31

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

สำหรับการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีค่าเท่ากับ 0.75 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) เท่ากับ 0.35 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) เท่ากับ 0.40 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (Q_p) เท่ากับ 0.67 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) มีค่าเท่ากับ 0.67 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) เท่ากับ 0.30 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) เท่ากับ 0.36 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (Q_p) เท่ากับ 0.61 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4-19

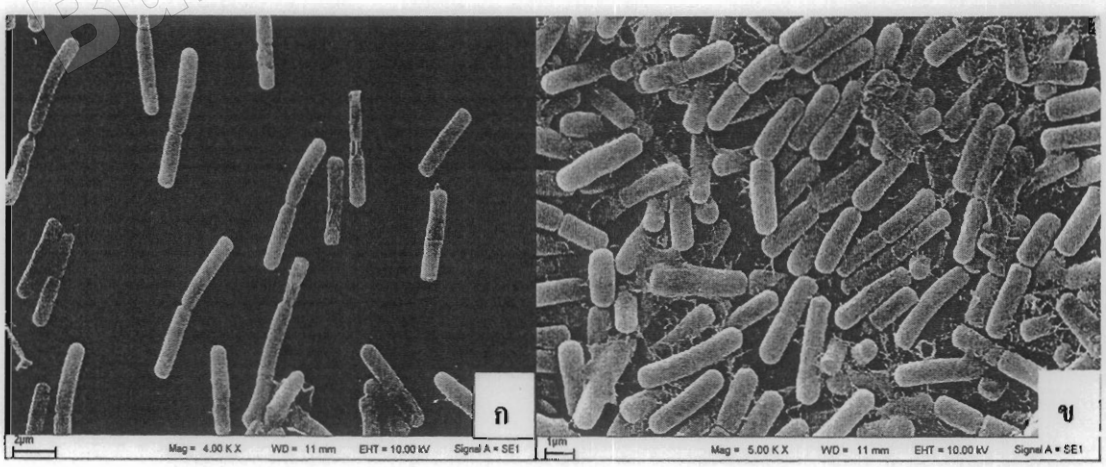
ตารางที่ 4-19 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (*Qp*) ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

สายพันธุ์แบคทีเรีย	Yp/x (g PHB/g Cell)	Yp/s (g PHB/g substrate)	Yx/s (g Cell/g substrate)	*Qp* (g/l/h)
สายพันธุ์เดิม	0.67	0.30	0.36	0.61
สายพันธุ์กลายซ้ำ	0.75	0.35	0.40	0.67
ผลได้ทางทฤษฎี (theoretical yield)	~0.8-0.9	0.38	~0.45	

4. การศึกษาลักษณะสัณฐานของแบคทีเรีย

4.1 การส่องตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

จากการตรวจสอบลักษณะสัณฐานของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ดังแสดงในภาพที่ 4-22 พบว่า รูปร่างของเชื้อสายพันธุ์เดิม มีลักษณะเป็นท่อนยาว (ภาพที่ 4-22ก) ส่วนเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีลักษณะรูปร่างเปลี่ยนไป คือ เป็นท่อนสั้น แต่มีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจากมีการสะสมของ PHB เกิดขึ้น (ภาพที่ 4-22ข)

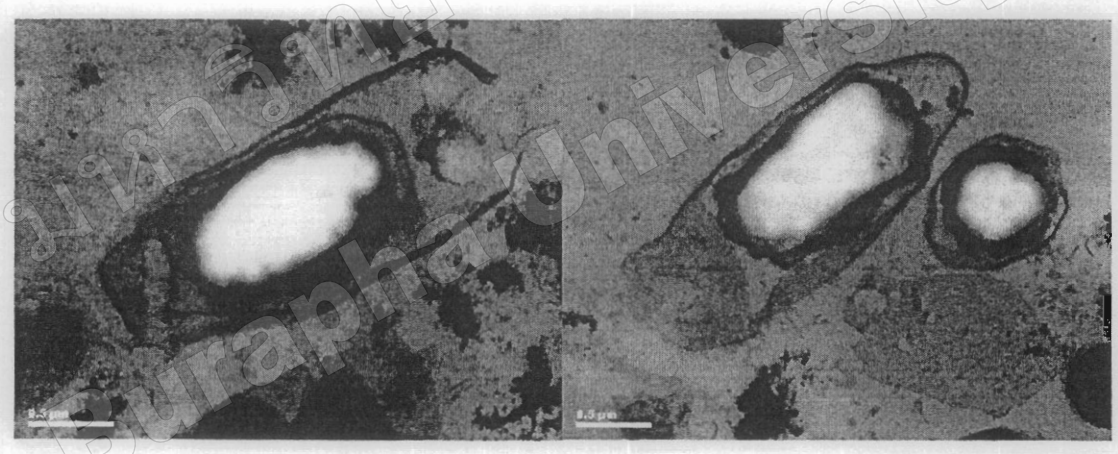


ภาพที่ 4-22 ลักษณะของเซลล์จุลินทรีย์ที่มีการสะสม PHB (ก) เชื้อสายพันธุ์เดิม และ (ข) เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

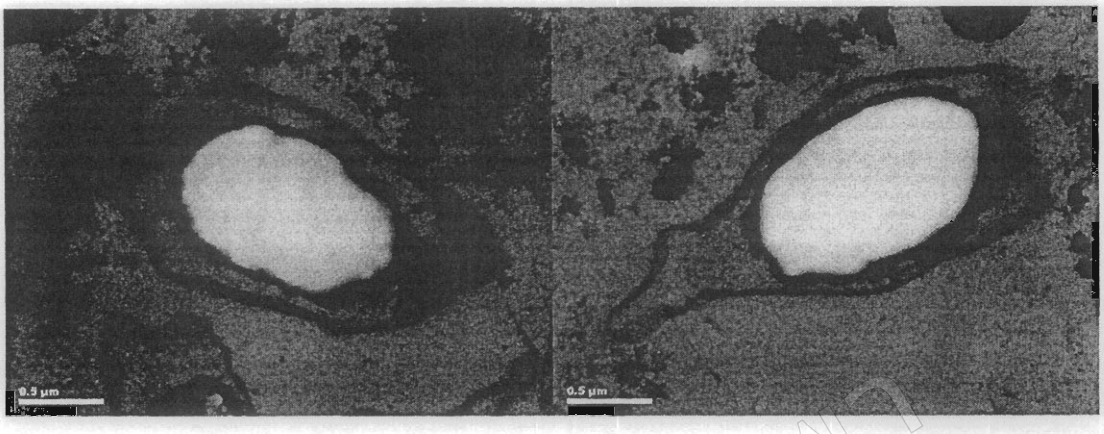
4.2 การส่องตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

จากการตรวจสอบลักษณะสัณฐานของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่า เชื้อสายพันธุ์เดิม มีการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตภายในแกรนูลปริมาณน้อย และลักษณะของผนังเซลล์ยังคงรูปร่างเดิม (ภาพที่ 4-23) ส่วนเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ภายในแกรนูลปริมาณสูงกว่าเชื้อสายพันธุ์เดิม โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางสูงกว่า และพบว่าลักษณะของผนังเซลล์มีรูปร่างเปลี่ยนไป เนื่องจากเชื้อถูกเหนี่ยวนำซ้ำด้วยรังสีและสารเคมี ซึ่งมีผลให้เชื้อมีรูปร่างเปลี่ยนไปและมีการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงขึ้น (ภาพที่ 4-24) สอดคล้องกับการศึกษาของ Luengo et al. (2003) ที่พบว่า ถ้าเซลล์มีการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตในปริมาณมากจะทำให้รูปร่างเปลี่ยนแปลงไป และการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจะหยุดที่ปริมาณหนึ่งแม้ว่าเอนไซม์และสารตั้งต้นที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์ยังคงมีอยู่ ทั้งนี้เนื่องจากเนื้อที่ภายในเซลล์ที่มีอยู่จำกัด



ภาพที่ 4-23 ลักษณะของเชื้อสายพันธุ์เดิม ที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

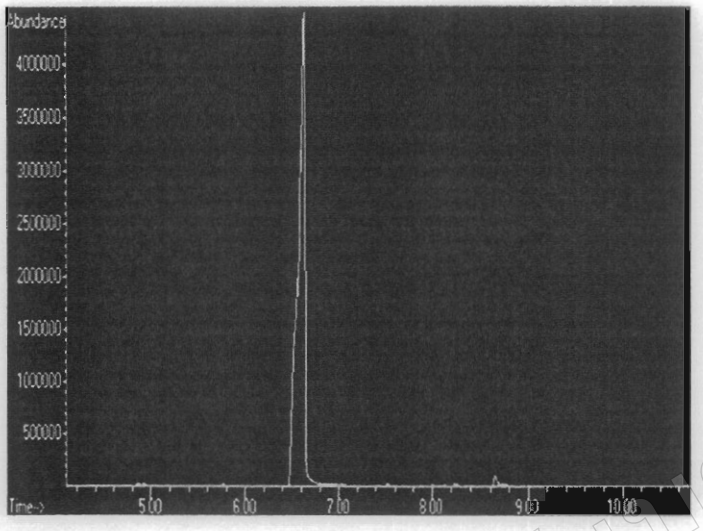


ภาพที่ 4-24 ลักษณะของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

5. การตรวจสอบชนิดและปริมาณของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

จากการเตรียม methyl ester (เมธิล เอสเทอร์) ของพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดเซลล์ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำและสายพันธุ์เดิมที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อทดสอบด้วยเครื่อง GC-MS พบ โครมาโตแกรม 1 โครมาโตแกรม โดยเชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีโครมาโตแกรมเด่นเพียงชนิดเดียวที่ retention time เท่ากับ 6.573 นาที ดังแสดงในภาพที่ 4-25 ซึ่งเป็น retention time เดียวกับโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Poly [(R)-3-hydroxybutyric acid] (ภาพที่ 4-26) เมื่อตรวจสอบค่ามวลสเปคตรัม (Mass spectra) ของโครมาโตแกรมที่สกัดได้โดยเทียบกับ Library search NIS08 พบว่า ที่ retention time เท่ากับ 6.573 คือ พอลิเมอร์ชนิด Butanoic acid, 3-hydroxy-methyl ester ซึ่งมีค่ามวลสเปคตรัมเท่ากับ 74, 87 และ 103 (ภาพที่ 4-27 และภาพที่ 4-28) ซึ่งสรุปได้ว่า เชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตพอลิเมอร์ชนิดพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสะสมภายในเซลล์เป็นส่วนใหญ่

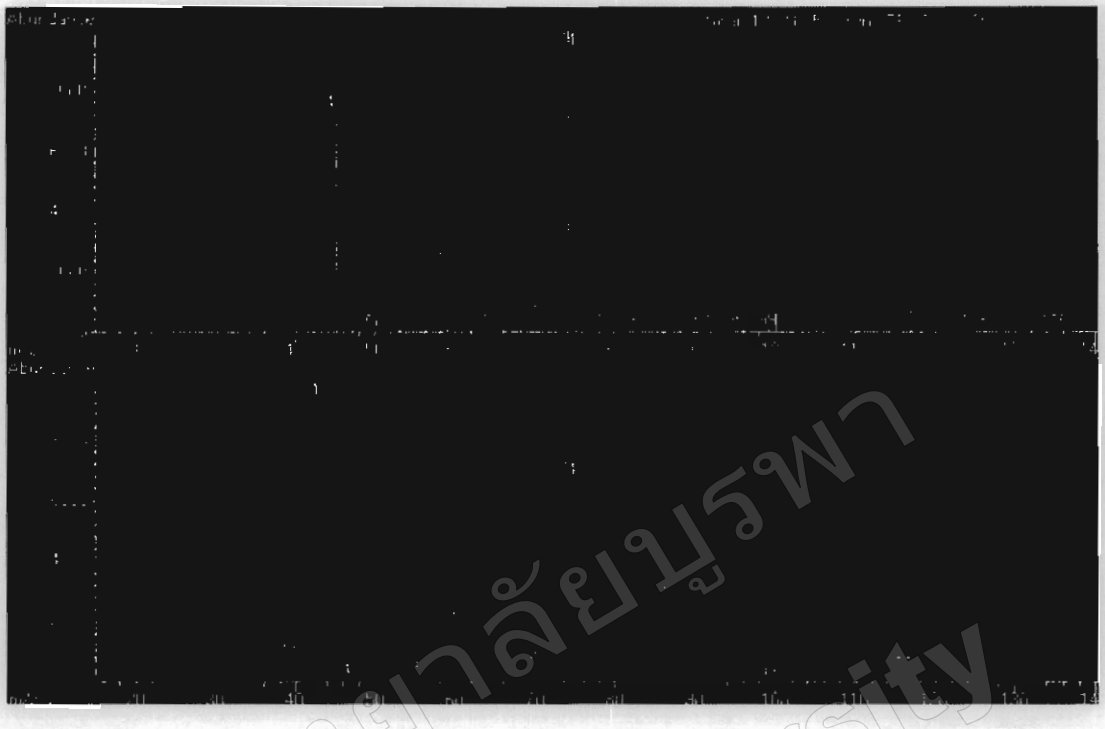
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



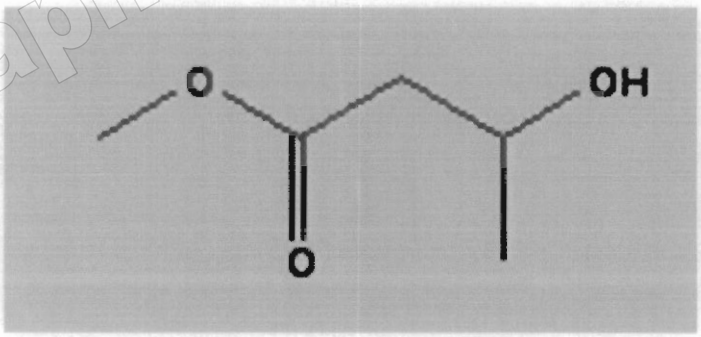
ภาพที่ 4-25 โครมาโตแกรมของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

ภาพที่ 4-26 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน PHB จาก Aldrich โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็น internal standard

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-27 มวลสเปคตรัมของ Butanoic acid, 3-hydroxy-methyl ester ที่สกัดได้จากเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเทียบกับมวลสเปคตรัมของสาร PHB จาก Library search NIST08



ภาพที่ 4-28 สูตรโครงสร้างของ Butanoic acid, 3-hydroxy-methyl ester ที่สกัดได้จากเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการคำนวณปริมาณของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตที่ผลิตได้ภายในเซลล์โดยเทียบกับสารมาตรฐานพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ในสูตรอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำสามารถผลิตได้ เท่ากับ 0.70

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

กรัมต่อกรัมของมวลเซลล์แห้ง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิมผลิตได้ เท่ากับ 0.58 กรัมต่อกรัมของมวลเซลล์แห้ง ดังแสดงในตารางที่ 4-20

ตารางที่ 4-20 ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ภายในเซลล์ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน PHB จาก Aldrich

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ปริมาณ PHB (กรัมต่อกรัมของมวลเซลล์แห้ง)
สายพันธุ์เดิม	0.58
สายพันธุ์กลายซ้ำ	0.70

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University