บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

อภิปรายผล

1. การเหนี่ยวนำแบคทีเรียด้วยสารเคมี และรังสีร่วมกับสารเคมี

จากการนำเชื้อสายพันธุ์เดิม (*A. latus* TISTR 1403/γ-2AA) มาทำการเหนี่ยวนำซ้ำด้วยวิธีต่างๆ พบว่า สามารถคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตภายในเซลล์ได้สูงขึ้น คือ เชื้อสายพันธุ์เดิมที่ผ่านการเหนี่ยวนำซ้ำโดยได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน จำนวน 2 ครั้ง และสารอะคริฟลาวิน ซึ่งใช้ชื่อเรียกว่า สายพันธุ์กลายซ้ำ โดยสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 5.45±0.14 และ 3.50±0.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 64.22 ของมวลเซลล์แห้ง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hikmet et al. (2003) ที่ทำการเหนี่ยวนำแบคทีเรียเพื่อผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ได้แก่ *Bacillus megaterium* Y6, *B. subtilis* K8, *B. sphaeicus* X3 และ *B. firmus* G2 โดยใช้สารอะคริ ฟลาวินและ 5-โบรโมยูราซิล พบว่า แบคทีเรียที่ได้รับสารเคมีสามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิม และรายงานของ Sangkharak and Prasertsan (2008) ที่ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต พบว่า *Rhodobacter sphaeroides* ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี สามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิมถึง 3.6 เท่า รวมถึงงานวิจัยของ Vu et al. (2009) ที่รายงานว่าการเหนี่ยวนำเชื้อซ้ำด้วยวิธีต่าง ๆ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตผลิตภัณฑ์ให้สูงกว่าสายพันธุ์เดิมถึง 2.03 เท่า

ดังนั้นวิธีการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายด้วยวิธีต่าง ๆ ทั้งทางกายภาพ เคมี และอื่น ๆ จะช่วยทำให้แบคทีเรียสามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้ปริมาณเพิ่มสูงขึ้น

2. ผลของการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

2.1 ผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารสำหรับการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตทั้ง 3 สูตร พบว่า การเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำ เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารทั้ง 3 สูตร มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ในสูตรอาหาร DSMZ catalogue (1993) สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงที่สุด โดยเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 14.80±0.01 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮ ดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 9.90±0.01 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 66.89 ของมวลเซลล์แห้ง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิมสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 5.90±0.06 และ 4.80±0.00 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 81.36 ของมวลเซลล์แห้ง อาจเป็นผลเนื่องจากสูตรอาหาร DSMZ catalogue มีน้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน รวมทั้งมีการเติมแหล่งไนโตรเจน และสารอาหารตัวอื่น ๆ ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าสูตรอาหาร El-Sayed et al. (2009) และ Savenkova et al. (1999) ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Yüksekdag, Aslim, Beyatil and Mercan (2004) ที่ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของ *Bacillus subtilis* 25 และ *B. megaterium* 12 โดยเลี้ยงในอาหารที่เติมกลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส อะราบิโนส แมนนิทอล พบว่า *B. subtilis* 25 และ *B. megaterium* 12 สามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุด เท่ากับ 0.24 และ 0.31 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 19.51 และ 19.49 ของมวลเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และสูงกว่าการศึกษาของ Kim, Lee and Kim (2005) ที่เลี้ยง *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 ในอาหารที่ใช้น้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดร้อยละ 60 ของมวลเซลล์แห้ง

การคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) ค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) มีความสำคัญสำหรับการเพิ่มขนาดการผลิตในระดับอุตสาหกรรม (เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์, 2551) ซึ่งพบว่าการใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน ส่งผลให้เชื้อสามารถเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้ต่างกัน โดยเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำที่เลี้ยงในสูตรอาหาร DSMZ catalogue (1993) ซึ่งใช้น้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) สูงสุด เท่ากับ 1.07 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร ค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) เท่ากับ 0.68 กรัม

ผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) เท่ากับ 0.84 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) สูงสุดเท่ากับ 0.38 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร ค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) เท่ากับ 0.31 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) เท่ากับ 0.64 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ดังนั้นจะเห็นได้ว่า การเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ในสูตรอาหารที่มีน้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน จึงเหมาะสมสำหรับการนำมาใช้ เนื่องจากเชื้อสามารถสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตภายในเซลล์ได้ดีที่สุด

2.2 ผลของการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

จากเป้าหมายของการศึกษาที่ต้องการเลือกใช้วัตถุดิบราคาถูกมาใช้เพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งถือว่าเป็นสิ่งจำเป็นมาก โดยวัตถุดิบราคาถูกที่นำมาใช้ เช่น กากน้ำตาล แป้งมันสำปะหลัง กากมันสำปะหลัง กรดไขมัน ซูโครส หางนม กลีเซอรอล ของเสียจากกระบวนการบำบัดน้ำเสีย วัสดุจำพวกเซลลูโลสและน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส เป็นต้น (Nath et al., 2008; Leda et al., 2009) ซึ่งงานวิจัยครั้งนี้เลือกใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนราคาถูก

จากการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำ ในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue (1993) ที่ใช้กากน้ำตาลความเข้มข้น 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีน้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นการเจริญจะเริ่มลดลง ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่มีค่าลดลง เมื่อเชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้น เนื่องจากเชื้อนำน้ำตาลไปใช้เพื่อการเจริญและสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยดึงไปใช้ผ่านวิถีเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตเพื่อสังเคราะห์ acetyl-CoA จากนั้น acetyl-CoA จะถูกส่งเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์เพื่อให้ได้พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงในระหว่างการเจริญของเชื้อ (Verlinden et al., 2007)

จากการศึกษาพบว่า เชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูง เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 7.80±0.11 และ 6.20±0.14 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 79.49 ของมวลเซลล์แห้ง แต่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่ามีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 7.50±0.06 และ

5.45±0.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 72.67 ของมวลเซลล์แห้ง ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ทั้งนี้เชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงกว่ารายงานของ Kulpreecha et al. (2009) ที่ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจาก *B. megaterium* BA-019 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อสามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดคิดเป็นร้อยละ 55.46 ของมวลเซลล์แห้ง และการศึกษาของ Wang et al. (2013) ที่ทำการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อ *Alcaligenes latus* โดยใช้น้ำตาลหัวบีทเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อสามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ได้สูงสุดร้อยละ 36.66 ของมวลเซลล์แห้ง

จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการใช้กากน้ำตาลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมสำหรับการนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน เนื่องจากสามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูง รวมทั้งมีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สูงสุดโดยเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีค่าเท่ากับ 0.85 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม มีค่าเท่ากับ 0.70 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ และมีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สูงสุด โดยเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีค่าเท่ากับ 0.33 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม มีค่าเท่ากับ 0.26 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร

2.3 ผลของน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

แหล่งไนโตรเจนเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของแบคทีเรีย เพื่อนำไปสู่ระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากการใช้สารอาหารราคาถูกจะช่วยลดต้นทุนในการผลิต (Chomchai & Chongcharoen, 2012) ซึ่งงานวิจัยนี้เลือกใช้น้ำแช่ข้าวโพดมาเป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน โดยปรับความเข้มข้นที่ระดับ 2, 3 และ 4 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า การเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร สามารถเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุด โดยเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงที่สุด เท่ากับ 8.30±0.30 และ 7.20±0.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 86.75 ของมวลเซลล์แห้ง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิมสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 6.07±0.03 และ 4.00±0.10 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 65.90 ของมวลเซลล์แห้ง และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่ามีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้มีค่าสูงกว่ารายงานของ Mona et al. (2001) ที่เลี้ยง *B. megaterium* ในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้นร้อยละ 4 เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถ

ผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดร้อยละ 32.68 ของมวลเซลล์แห้ง และรายงานของ Khanna and Srivastava (2005) ที่เลี้ยง *R. eutropha* NRRLB 14690 โดยใช้น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดร้อยละ 43.34 ของมวลเซลล์แห้ง และสูงกว่าการศึกษาของ Chaijumrus and Udpuay (2008) ที่เลี้ยง *B. megaterium* ATCC 6748 โดยใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้นร้อยละ 6 เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดร้อยละ 35.00 ของมวลเซลล์แห้ง

จากการศึกษา พบว่า การใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน จะช่วยส่งเสริมการผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ โดยเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สูงสุด เท่ากับ 0.37 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหารและ 1.06 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สูงสุด เท่ากับ 0.17 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหารและ 0.68 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ

2.4 ผลของความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความจำเป็นต่อการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต (Sangkharak & Prasertsan, 2008) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำในอาหารที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร สามารถเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงที่สุด โดยเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุด เท่ากับ 15.62±0.00 และ 9.73±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 62.29 ของมวลเซลล์แห้ง ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์เดิม สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 8.75±0.07 และ 6.65±0.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 76.00 ของมวลเซลล์แห้ง ซึ่งมีค่าสูงกว่าชุดควบคุมที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 2.3 กรัมต่อลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า การเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในปริมาณที่สูงขึ้น มีผลในการลดการเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ (Savenkova et al., 1999) ซึ่งแตกต่างกับงานวิจัยของ Ryn, Sei, Young and Ho (1997) ที่พบว่า การเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมีผลต่อการเพิ่มปริมาณการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อ อย่างไรก็ตาม เชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงกว่าการศึกษา

ของ Sangkharak and Prasertsan (2008) ที่เลี้ยง *Rhodobacter shaeroides* N 20 ในอาหารที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ซึ่งผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 6.57 กรัมต่อลิตร และการศึกษาของ Ramchander, Girisham and Reddy (2010) ที่เลี้ยง *Rhodopseudomonas palustris* ในอาหารที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต สามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 0.181 กรัมต่อลิตร

จากการศึกษาพบว่าการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร จะช่วยส่งเสริมการเจริญและสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ โดยเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สูงสุด เท่ากับ 0.39 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร และ 0.98 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สูงสุด เท่ากับ 0.30 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร และ 0.63 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ

จะเห็นได้ว่า การเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ในสูตรอาหารที่มีการปรับสภาวะให้เหมาะสม จะช่วยส่งเสริมการเจริญและสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตให้มีปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นได้

3. ผลของความสามารถในการผลิต PHB ในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

3.1 ผลของการผลิต PHB ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch Culture)

จากการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะ พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10-30 ชั่วโมง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม มีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12-30 ชั่วโมง จากนั้นการเจริญจึงเริ่มคงที่ สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะลดลงตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง เนื่องจากเชื้อนำไปใช้เพื่อการเจริญ และเมื่อสารอาหารเริ่มลดน้อยลงจึงมีผลทำให้เชื้อมีการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ และภายใต้สภาวะที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจน และมีปริมาณคาร์บอนมากเพียงพอ (ธงชัย วงศ์สุวรรณ, 2550)

จากการศึกษา พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุด เท่ากับ 18.73±0.06 และ 11.83±0.29 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 63.16 ของมวลเซลล์แห้ง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 14.45±0.07 และ 8.70±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 60.21 ของมวลเซลล์แห้ง ซึ่งพบว่าผลที่ได้ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

($p<0.05$) และมีค่าสูงกว่าการศึกษาของ Kulpreecha et al. (2009) ที่เลี้ยง *B. megaterium* BA-019 เพื่อผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยทำการเพาะเลี้ยงแบบกะ และใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 8.80 และ 5.41 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และการศึกษาของ El-sayed et al. (2009) ที่เลี้ยง *A. latus* โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบกะ และใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 8.73 และ 4.94 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) และสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีค่าเท่ากับ 0.78 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ และ 0.37 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม มีค่าเท่ากับ 0.69 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ และ 0.29 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Montaser et al. (2011) ที่เลี้ยง *Azotobacter Beijerinckii* DSMZ 1041 เพื่อผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยทำการเพาะเลี้ยงแบบกะ และใช้น้ำตาลกลูโคส และแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งอาหาร พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) เท่ากับ 0.20 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร และงานวิจัยของ Tripathi et al. (2013) ที่ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจาก *Alcaligenes* sp. NCIM 5085 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะ และใช้กากน้ำตาลอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 11.00±0.50 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 8.58±0.40 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) เท่ากับ 0.78 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร

3.2 ผลของการผลิต PHB ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ (Fed-Batch Culture)

จากการศึกษาข้างต้นที่ทำการเพาะเลี้ยงแบบกะ ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของเซลล์ยังไม่มากนัก จึงทำให้การสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตภายในเซลล์มีปริมาณน้อยเช่นกัน จึงทำให้มีแนวคิดในการเลือกใช้การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์สูงขึ้น และส่งผลให้เชื้อมีการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เพิ่มสูงขึ้น (Chomchai & Chongcharoen, 2012)

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณ พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุด เท่ากับ 49.30±0.20 และ 32.20±0.10 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 65.31 ของมวลเซลล์แห้ง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 47.53±0.06 และ 29.43±0.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 61.91 ของมวลเซลล์แห้ง ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติ ($p<0.05$) ทั้งนี้ปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตที่เชื้อทั้งสองสายพันธุ์ผลิตได้มีค่าสูงกว่าการศึกษาของ Park and Kim (2011) ที่เลี้ยง *R. eutropha* เพื่อผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ และใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สามารถผลิตมวลเซลล์และปริมาณพอลิเบต้าไฮ ดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 32.00 และ 25.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และการศึกษาของ Gahlawat and Srivastava (2013) ที่เลี้ยง *Azohydromonas australica* โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ และใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 29.71 และ 22.65 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) และสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีค่าเท่ากับ 0.75 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ และ 0.35 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม มีค่าเท่ากับ 0.67 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ และ 0.30 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ Khanna and Srivastava (2006) ที่เลี้ยง *R. eutropha* NRRLB 14690 โดยใช้น้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ พบว่า มีสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) เท่ากับ 0.36 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร แต่มีค่าต่ำกว่างานวิจัยของ Park and Kim (2011) ที่เลี้ยง *R. eutropha* เพื่อผลิต PHB โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ และใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า มีสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) เท่ากับ 0.80 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร

4. การตรวจสอบชนิดและปริมาณของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

จากการตรวจสอบชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยเครื่อง GC-MS ผลที่ได้พบว่าเป็นพอลิเมอร์ชนิดเดียวกับสารมาตรฐาน PHB มีมวลสเปคตรัม เท่ากับ 74, 87 และ 103 โดยพบว่า เชื้อ *A. latus* เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ 1 (Class I) ดังนั้น การสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจะเกี่ยวข้องกับ β-hydroxybutyryl-coenzyme A (HBCoA) โดยมีการสังเคราะห์ (R)-3-hydroxy fatty acid จากตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 ถึง 5 (Yolande et al., 2008) และจากการรายงานของ Rijk et al. (2005) ที่ระบุว่ามวลสเปคตรัมหลักของสาร 3-hydroxy alkanoic acids methyl ester เท่ากับ 103 ซึ่งเกิดจากการแตกพันธะ α ในคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 4 และมวลสเปคตรัมเท่ากับ 74 ซึ่งเป็นค่าที่สำคัญสามารถระบุว่าสารที่ทดสอบคือ พอลิเมอร์ชนิดพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ที่เกิดจากการแตกตัวของไอออนของหมู่ methyl ester

จากผลการทดสอบพบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตพอลิเมอร์ชนิดพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสะสมภายในเซลล์เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Sangkharak (2007) ที่ศึกษาการ*เลี้ยง R. sphaeroides* N20 ในน้ำเสียที่มีการเติมกรดวาเลอริก 40 มิลลิโมลาร์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า พอลิเมอร์ที่ผลิตได้มีสัดส่วน HB และ HV เท่ากับ 30.65 และ 69.95 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำ สามารถสรุปผลการศึกษาได้ดังนี้

การเหนี่ยวนำซ้ำเชื้อด้วยวิธีต่าง ๆ โดยการนำเชื้อสายพันธุ์เดิม (*A. latus* TISTR 1403/γ-2AA) มาทำการเหนี่ยวนำซ้ำโดยได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน จำนวน 2 ครั้ง และสารอะคริฟลาวิน ซึ่งใช้ชื่อเรียกว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ พบว่า เชื้อสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุด คือ 5.45±0.14 และ 3.50±0.00 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 64.22 ของมวลเซลล์แห้ง

สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต เชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีการเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue (1993) โดยการใช้กากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร และเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 15.62±0.00 และ 9.73±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 62.29 ของมวลเซลล์แห้ง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 8.75±0.07 และ 6.65±0.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 76.00 ของมวลเซลล์แห้ง

เมื่อทำการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงสู่ระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบกะและเติมกะ พบว่า การเพาะเลี้ยงแบบกะ เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุด เท่ากับ 18.73±0.06 และ 11.83±0.29 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 63.16 ของมวลเซลล์แห้ง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 14.45±0.07 และ 8.70±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 60.21 ของมวลเซลล์แห้ง ในขณะที่ การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุด เท่ากับ 49.30±0.20 และ 32.20±0.10 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 65.31 ของมวลเซลล์แห้ง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม

สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 47.53±0.06 และ 29.43±0.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 61.91 ของมวลเซลล์แห้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University