4. วิจารณ์ผลการทดลองและสรุปผลการทดลอง

4.1 วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1.1 สามารถใช้กากน้ำตาลและน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ในอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิต PHB ได้ เนื่องจากในกระบวนการบำบัดน้ำแช่ข้าวโพดและกากน้ำตาล เป็นเพียงการบำบัดในเบื้องต้นเพื่อแยกตะกอนออกก่อนใช้เท่านั้น อาจมีสารยับยั้งการเจริญเติบโตปนเปื้อนอยู่บางส่วน ซึ่งส่งผลต่ออัตราการผลิต PHB โดยตรง และจากผลการทดลองพบว่า *B. megaterium* สามารถทนต่อสารยับยั้งเหล่านี้ได้ดีที่สุด ส่วน *A. eutrophus* โดยปกติจะถูกนำมาใช้ในการผลิต PHB เชิงการค้าเนื่องจากให้ผลผลิตสูง แต่เนื่องจากมีสารยับยั้งปนอยู่จึงไม่สามารถให้ผลผลิตได้ดีเท่าที่ควร ให้ปริมาณการผลิตใกล้เคียงกับ *B. megaterium* ส่วนแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ให้ผลผลิตน้อยกว่า

4.1.2 แบคทีเรียแต่ละชนิดสามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิต PHB สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกากน้ำตาลและน้ำแช่ข้าวโพดที่ความเข้มข้นเดียวกันหมดคือ 4:4 (%w/v) ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 4 ให้อัตราการผลิตของสาร PHB มากที่สุด เนื่องจากความเข้มข้นของกากน้ำตาลสูงกว่าร้อยละ 4 เชื้อ *B. megaterium* จะนำกากน้ำตาลไปใช้ในการสร้างพลังให้แก่เซลล์เพื่อการเจริญ และการแบ่งเซลล์มากกว่าที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์สาร PHB ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำรอง โดยสามารถสังเกตุจากอัตราการผลิตชีวมวลของเชื้อ *B. megaterium* ที่สูงขึ้นในความเข้มข้นที่สูงกว่าร้อยละ 4 ซึ่งเพราะว่ามีปริมาณความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่มากเกินพอ และเมตาบอลิซึมส่วนใหญ่จะอยู่ที่ TCA cycle เพื่อการเจริญเติบโต ส่วนความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ต่ำกว่าร้อยละ 4 ซึ่งแหล่งคาร์บอนไม่เพียงพอต่อการเจริญ ดังนั้นเชื้อ *B. megaterium* จึงนำกากน้ำตาลไปผลิตสาร PHB เพื่อเป็นพลังงานสำรอง โดยเปลี่ยนการนำ Acetyl-CoA เข้าสู่วิถีสังเคราะห์ PHB (Anderson et al.1990) แต่ก็ยังมีปริมาณน้อย เพราะแหล่งคาร์บอนไม่เพียงพอเพื่อผลิตสาร PHB ซึ่งปริมาณความเข้มข้นกากน้ำตาลที่เหมาะสมคือ ร้อยละ 4 ของกากน้ำตาล

4.1.3 ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 4 ร่วมกับความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดร้อยละ 4 ให้อัตราการผลิตของสาร PHB มากที่สุด ซึ่งเป็นเหตุผลของแหล่งคาร์บอนเช่นเดียวกับข้อ 1 แต่ส่วนของน้ำแช่ข้าวโพดเป็นปัจจัยที่ไปส่งเสริมให้มีการสะสมสาร PHB มากขึ้น เนื่องจากน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งของธาตุไนโตรเจนหรือโปรตีนต่างๆ ซึ่งธาตุไนโตรเจนนั้นเป็นองค์ประกอบสำคัญของเอนไซม์ PHA syntheses และ ß-ketothiolase ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ PHB หรือPHA ชนิดต่างๆและการสร้าง PHB หรือPHAแกรนูล (Rehm, 2003) ดังนั้นเมื่อปริมาณของธาตุไนโตรเจนมากขึ้น อาจจะส่งผลทำให้มีเอนไซม์ PHA syntheses เช่นกัน และมีผลต่อเนื่องให้มีการสังเคราะห์สาร PHB มาขึ้นด้วย ส่วนความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดสูงมีผลต่อการลดอัตราการสร้างสาร PHB อาจเนื่องมาจากปริมาณของเอนไซม์ PHA syntheses มาเกินไปทำให้เกิดการยับยั้งแบบ negative feedback เพื่อรักษาสภาพสมดุลของเซลล์ (Homeostasis) ไม่ให้มีการนำ Acetyl-CoA เข้าสู่วิถีสังเคราะห์ PHB มากจนไม่มีพลังงานให้กับเซลล์ขณะนั้น (Stubbe et al., 2005) ซึ่งปริมาณความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดที่เหมาะสมคือ ร้อยละ 4

4.1.4 การขยายขนาดการผลิตจาก ปริมาตรอาหารเลี้ยงแบคทีเรียเริ่มต้น 150 ml เป็น 300 ml 600 ml และ 1000 ml ตามลำดับ พบว่าให้อัตราการเจริญเติบโตและอัตราการผลิต PHB ใกล้เคียงกัน

4.1.5 วิธีแยกบริสุทธิ์ PHB พบว่าวิธีการสกัดด้วย Chloroform ให้ผลดีที่สุด ยังไม่สามารถหาตัวทำละลายอื่นมาทดแทนได้

4.1.6 การศึกษาการสะสมของสาร PHB ภายในเซลล์ *A. eutrophus* เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าการสะสมของสาร PHB ภายในเซลล์ *A. eutrophus* จะมีเป็นลักษณะที่ถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้ม โดยสังเกตจากการที่ OsO_4 ติดที่เยื่อหุ้มแกรนูล ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีการสร้างแกรนูลภายในเซลล์จุลินทรีย์ของเอกสารอ้างอิง (Rehm, 2003)

4.1.7 การวิเคราะห์โครงสร้างและมวลโมเลกุลของ PHB ที่สกัดได้จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ ด้วยตัวทำละลาย Chloroform มีค่าใกล้เคียงกัน พบว่าโครงสร้างของสาร PHB ที่สกัดได้เป็นลักษณะหน่วยโมเลกุลที่มีจำนวนคาร์บอน 4 อะตอม และไฮโดรเจน 6 อะตอม เนื่องจากพีคของ ^{13}C NMR มี 4 พีค แสดงจำนวนคาร์บอนอะตอมที่ชัดเจน และ ^{1}H NMR แสดงตำแหน่งของไฮโดรเจนอะตอมบนคาร์บอนอะตอมที่ชัดเจนเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่า มีพีคโครงสร้างของสาร PHB ที่สกัดได้สอดคล้องกับเอกสารอ้างอิงอีกด้วย (Hahn et al.1994; Pal et al.2002)

4.1.8 มวลโมเลกุลของสาร PHB ที่สกัดได้จาก *B. megaterium* มีมวลโมเลกุลมากกว่า $39x10^5$ Da อาจเนื่องจากชนิดของเชื้อที่สร้างสาร PHB มีการควบคุมการสร้างที่ระดับจีนหรือเอนไซม์ สภาพแวดล้อม เช่น ชนิดของแหล่งอาหาร ปริมาณออกซิเจน เป็นต้น นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับ ชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยง วิธีการสกัดสาร PHB ชนิดของตัวทำละลายและระยะเวลาการสกัด อัตราการเจริญเติบโตและลักษณะการหมัก โดยเฉพาะการให้ออกซิเจนในกระบวนการหมัก (Anderson et al.1990; Punrattanasin.2001)

4.2 สรุปผลการทดลอง

4.2.1 ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 4 ร่วมกับความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดร้อยละ 4 ให้อัตราการผลิตของสาร PHB มากที่สุด 52 $mg/L.h^{-1}$ โดย *B. megaterium* และ *A. eutrophus* มีการสะสมสาร PHB ภายในเซลล์ ร้อยละ 41.31 (w/w)

4.2.2 การขยายขนาดการผลิตในปริมาตร 150 ml 300 ml 500ml และ1000ml ให้ผลผลิตไม่แตกต่างกัน

4.2.3 เซลล์ *A. eutrophus* มีการสะสมสาร PHB ภายในเซลล์ เป็นลักษณะของแกรนูล

4.2.4 โครงสร้างของสาร PHB ที่สกัดได้จากเซลล์แบคทีเรียชนิดต่างๆที่เลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลและน้ำแช่ข้าวโพด ด้วยวิธี Chloroform extraction มีจำนวนคาร์บอนอะตอมในหน่วยย่อยของสาร

PHB จำนวน 4 อะตอม และมีจำนวนไฮโดรเจนอะตอมจำนวน 6 อะตอม และยังมีพบว่ามีโครงสร้างของโมเลกุลเหมือนกับโครงสร้างของโมเลกุลของสาร PHB ในเอกสารอ้างอิง

4.2.5 มวลโมเลกุลของสาร PHB ที่สกัดได้จาก *B. megaterium* ที่เลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลและน้ำแช่ข้าวโพด ด้วยวิธี Chloroform extraction มีมวลโมเลกุลสูงสุดคือมากกว่า 39 x 10^5 Da ส่วน PHB ที่ได้จากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จะมีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วงใกล้เคียงกันคือ 21-58 x 10^4 Da

4.2.6 คุณสมบัติทนต่อความร้อนของ PHB ที่ผลิตได้ในแบคทีเรียแต่ละชนิดมีค่าใกล้เคียงกันและมีค่าใกล้เคียงกับ PHB ที่ผลิตเป็นการค้าด้วย

4.3 ข้อเสนอแนะ

4.3.1 อัตราการผลิตของสาร PHB จากแบคทีเรียที่ได้จากการทดลองใช้กากน้ำตาลและน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งอาหาร ยังให้อัตราการผลิตต่ำเมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่น ดังนั้นควรหาสภาวะที่เหมาะสมอื่นหรือปัจจัยอื่นๆ เพื่อให้อัตราการผลิตของสาร PHB สูงขึ้นจากเซลล์ *B. megaterium* และ *A. eutrophus*

4.3.2 หาวิธีบำบัดน้ำแช่ข้าวโพดเพื่อลดปริมาณสารยับยั้งการเจริญเติบโตถ้าจำเป็น เนื่องจากการเพิ่มขั้นตอนการบำบัดน้ำแช่ข้าวโพดจะทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นด้วย หากขั้นตอนการลดสารยับยั้งการเจริญเติบโตได้ผลไม่คุ้มค่าก็ไม่ควรเพิ่มขั้นตอนนี้ในเชิงพานิชณ์

4.3.3 หาวัตถุดิบทดแทนแหล่งใหม่ ที่ราคาถูก และมีปริมาณมาก

4.3.4 การตัดต่อยีนจาก *A. eutrophus* และ/หรือ *B. megaterium* เข้าไปใน E. coli เนื่องจาก *A. eutrophus* ให้อัตราการผลิต PHB ที่สูงแต่การสกัดทำได้ยากเนื่องจากมีผนังเซลล์หนา ส่วน *B. megaterium* ให้อัตราการผลิต PHB ไม่สูงมากแต่มีความทนทานต่อสารยับยั้งการเจริญเติบโต หากนำคุณสมบัติเหล่านี้ไปไว้ใน *E. coli* ก็จะทำให้สามารถเพิ่มอัตราการผลิต PHB ได้และยังทนต่อสารยับยั้งในอาหารเลี้ยงอีกด้วย