บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 สายพันธุ์ที่แยกได้ในห้องปฏิบัติการของคณะผู้วิจัย โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต P(3HB) จากการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า โดยศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำอ้อยและยูเรียที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ โดยศึกษาผลของการจำกัดธาตุอาหารจำเป็นบางชนิดที่มีต่อการเจริญ การสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้แก่ ความเข้มข้นของไนโตรเจน (ยูเรีย) ความเข้มข้นของแมกนีเซียม (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต) และผลร่วมระหว่างโพแทสเซียมและฟอสเฟต (โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต) เพื่อกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) เพิ่มมากขึ้น ผลการวิจัยพบว่า *B. megaterium* BA-019 สามารถเจริญพร้อมกับการผลิต P(3HB) ได้ดีโดยใช้น้ำอ้อยและยูเรียเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนซึ่งมีราคาถูก โดยเชื้อสามารถเจริญและผลิต P(3HB) ได้ดีขึ้นในภาวะการเจริญที่ไม่สมดุล (unbalanced growth condition) ศึกษาการผลิต P(3HB) ในถังหมักโดยใช้ภาวะที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าไปเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อผลิต P(3HB) ในถังหมักโดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าปริมาณ P(3HB) สูงสุดที่ผลิตได้ต่ำกว่าเมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในขวดเขย่า แต่ความหนาแน่นของเซลล์และอัตราการผลิต P(3HB) เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักสูงกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า

5.1 การศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต

Keshavarz และ Roy (2010) รายงานว่า การสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ควรเป็นกระบวนการต่อเนื่อง (serial process) ซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรก จุลินทรีย์จะมีการเจริญในแหล่งคาร์บอนโดยการนำสารอาหารนั้นไปสร้างองค์ประกอบของเซลล์และผลิตเซลล์ปริมาณมาก ส่วนในขั้นตอนที่สอง มีการเติมสารอาหารเพื่อใช้ในการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) เซลล์ปริมาณมากที่ได้ในขั้นตอนแรกก็จะใช้สารอาหารนั้นเพื่อนำไปสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดยอาจมีการเจริญเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหรืออาจไม่มีการเจริญเพิ่มขึ้น แต่ขนาดของเซลล์จะใหญ่ขึ้นเนื่องมาจากการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ภายในเซลล์ ดังนั้นในการทำให้เชื้อมีการผลิตเซลล์ปริมาณมากในขั้นตอนแรกจะส่งผลทำให้ได้ปริมาณ P(3HB) เพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต โดยเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อเพื่อผลิตเซลล์ให้ได้ปริมาณมากในขั้นตอนแรก พบว่าเซลล์มีอัตราการเจริญจำเพาะ(μ) สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 6 เท่ากับ 0.759 ต่อชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกกล้าเชื้ออายุ 6 ชั่วโมงสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเพื่อการสร้างและสะสม P(3HB)

5.2 การผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดทดลองภายใต้ภาวะการเจริญที่สมดุล

Choi และ Lee (1999) รายงานว่า ปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งที่มีผลต่อต้นทุนการผลิต P(3HB) คือ ราคาของแหล่งคาร์บอนที่ใช้โดยคิดเป็น 70-80 เปอร์เซนต์ของต้นทุนวัตถุดิบทั้งหมด ดังนั้นถ้าสามารถเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกในการผลิต P(3HB) ก็จะมีผลทำให้ต้นทุนของการผลิต P(3HB) ลดลงได้มาก ซึ่งอาจเป็นไปได้ในการแข่งขันด้านราคากับพลาสติกที่สังเคราะห์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เช่น พอลิเอทธิลีน และพอลิโพรไพลีนได้

Liu และคณะ (1998) รายงานว่า recombinant *Escherichia coli* สายพันธุ์ HMS174/pTZ18u-PHB สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดยการใช้กากน้ำตาลบีทเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส ทำให้ลดต้นทุนในการผลิต P(3HB) ได้ เนื่องจากกากน้ำตาลบีทเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกและหาได้ง่าย จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ recombinant *Escherichia coli* สายพันธุ์ HMS174/pTZ18u-PHB แบบ fed-batch ที่มีการควบคุมการป้อนสารอาหารด้วยวิธี pH-stat ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่า ได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 39.5 กรัมต่อลิตร ผลิต P(3HB) ได้เท่ากับ 80 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ดังนั้นในงานวิจัยนี้สนใจที่จะใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต P(3HB) เพื่อทำให้ต้นทุนในการผลิตลดลง เนื่องจากอ้อยเป็นพืชที่มีการเพาะปลูกมากในประเทศไทยและเป็นพืชที่สามารถตัดและเก็บเกี่ยวได้หลายครั้ง โดยในกระบวนการการผลิตน้ำตาลทรายจะใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบหลักและมีน้ำอ้อยเกิดขึ้นหลายขั้นตอน ซึ่งในน้ำอ้อยจะประกอบไปด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ โดยมีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบหลักเฉลี่ยประมาณ 93.22 เปอร์เซนต์ กลูโคสเฉลี่ยประมาณ 4.55 เปอร์เซนต์ ฟรุกโตสเฉลี่ยประมาณ 1.40 เปอร์เซนต์ (วิเคราะห์โดย HPLC) รวมทั้งวิตามินและธาตุอาหารเป็นจำนวนมาก (มิตรผลวิจัย, 2551) ซึ่งน้ำอ้อยในแต่ละครั้งจะมีปริมาณน้ำตาลเฉลี่ยแตกต่างกันตามลักษณะพันธุ์อ้อย ฤดูกาล สภาพดิน การเก็บรักษา และกรรมวิธีการผลิตของโรงงาน และอีกประการหนึ่ง คือ เชื้อ *B. megaterium* BA-019 สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ดีกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส และฟรุกโตสในการผลิต P(3HB) (รัตนศิริ มุทิตากุล, 2538) ส่วนแหล่งไนโตรเจนเลือกใช้ยูเรีย เนื่องจากมีราคาถูกและให้ผลผลิตดีกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต (อติพล บุญเรืองถาวร, 2543) โดยในงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาการผลิต P(3HB) ในภาวะการเจริญที่สมดุล (balanced growth condition) โดยเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเพื่อการสร้างและการสะสม P(3HB) (MSM) ผลการวิจัยนี้พบว่าเมื่อใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 7.23 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 2.94 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณเท่ากับ 40.69 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 18 ชั่วโมง

5.3 ศึกษาผลของการจำกัดธาตุอาหารแต่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินพอที่มีต่อการเจริญการสังเคราะห์และสะสม P(3HB)

5.3.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำอ้อยที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต P(3HB)

Liu และคณะ (1998) ศึกษาเปรียบเทียบการผลิต P(3HB) เมื่อใช้กากน้ำตาลบีทที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันโดยใช้ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 20 40 และ 60 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีความเข้มข้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร recombinant *Escherichia coli* สายพันธุ์ HMS174/pTZ18u-PHB สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้สูงสุด โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 16.7 กรัมต่อลิตรและผลิต P(3HB) ได้เท่ากับ 85 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 20 และ 40 กรัมต่อลิตร สามารถผลิต P(3HB) ได้เท่ากับ 68 และ 77 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ

Gouda และคณะ (2001) ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1-5 เปอร์เซนต์ที่เติมลงในอาหารสำหรับการผลิต พบว่ากากน้ำตาลความเข้มข้น 3 เปอร์เซนต์ทำให้ *Bacillus megaterium* เจริญได้ดีที่สุดและกากน้ำตาล 2 เปอร์เซนต์เชื้อสามารถผลิต P(3HB) ได้มากที่สุด คือ 46.3 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่พบว่าเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของกากน้ำตาลมากขึ้น ทำให้มีการผลิต P(3HB) ลดลง

งานวิจัยในขั้นตอนนี้ได้ศึกษาความเข้มข้นของน้ำอ้อยที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต P(3HB) โดยเปรียบเทียบการผลิต P(3HB) เมื่อใช้น้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมแตกต่างกันโดยใช้ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร *B. megaterium* BA-019 สามารถสังเคราะห์และสะสมP(3HB) ได้สูงสุด โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 8.92 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 3.85 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณเท่ากับ 43.16 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมงโดยได้ผลดีกว่าภาวะการเจริญที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร และเมื่อมีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเพิ่มขึ้นพบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้นแต่สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ลดลง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารอาหารที่สมบูรณ์มากกว่าส่งผลให้จุลินทรีย์นำสารอาหารที่มีอยู่อย่างสมบูรณ์ไปใช้ในการสร้างเซลล์และเพิ่มจำนวนมากกว่าจะนำไปสังเคราะห์และสะสมP(3HB) ซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานที่เก็บไว้ใช้ในยามขาดแคลนสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญ (Evan และคณะ, 1990) โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 11.09 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 3.78 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณเท่ากับ 34.12 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตรเท่ากับ และได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 13.31 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 1.56 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 11.70 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 50 กรัม

ต่อลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอจะมีค่าเหมาะสมอยู่ค่าหนึ่ง คือ มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 23 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน แต่ถ้ามากเกินไปจะส่งผลให้การสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ลดลง ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 30 กรัมต่อลิตร

5.3.2 การศึกษาผลของการจำกัดปริมาณไนโตรเจน

นอกจากการให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอมีผลต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) การจำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม หรือโพแทสเซียม ก็มีผลต่อการกระตุ้นให้เซลล์สังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้เพิ่มขึ้น (Pandian และคณะ,2010) โดย Beaulieu และคณะ, 1995 รายงานว่า ไนโตรเจนเป็นธาตุที่จุลินทรีย์ต้องการในช่วงการเจริญเพื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์ แต่ในช่วงที่มีการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) การจำกัดปริมาณไนโตรเจนมีส่วนกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) เพิ่มขึ้น

Gouda และคณะ (2001) ศึกษาผลของการจำกัดปริมาณไนโตรเจน โดยเลี้ยงให้ *Bacillus megaterium* ในอาหารสำหรับการผลิตที่มีความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพด 0.5-7 เปอร์เซนต์ พบว่าน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 3 เปอร์เซนต์ เชื้อสามารถผลิต P(3HB) ได้มากที่สุดเท่ากับ 49.12 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดมีผลทำให้ความสามารถในการผลิต P(3HB) ลดลง

งานวิจัยในขั้นตอนนี้ศึกษาผลของการจำกัดปริมาณไนโตรเจนในรูปของยูเรียในอาหาร MSM ที่มีผลต่อการผลิต P(3HB) โดยเปรียบเทียบการผลิต P(3HB) เมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมยูเรีย (N-free medium) โดยใช้ปริมาณคาร์บอนที่ได้จากการทดลองข้างต้น คือ 30 กรัมต่อลิตรส่วนสารอื่นใช้ในปริมาณเท่าเดิม (สูตรอาหาร MSM) พบว่าเมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร *B. megaterium* BA-019 สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้สูงสุด โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 8.88 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 3.87 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 43.25 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมง เมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้นลดลง คือ 0.6 0. 4 0.2 และไม่มีการเติมยูเรีย พบว่าทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตลดลงอย่างชัดเจน โดยได้ P(3HB) เท่ากับ 32.63 38.06 38.71 และ 41.11 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และเมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้น 1.0 และ 1.2 กรัมต่อลิตร พบว่าได้ปริมาณ P(3HB) ใกล้เคียงกัน คือ เท่ากับ 39.01 และ 38.91 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ จากการที่แหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญสำหรับการเจริญเติบโต คือ เป็นสารสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีน ดังนั้นถ้ามีแหล่งไนโตรเจนน้อยหรือไม่มีเลยย่อมทำให้เซลล์เจริญได้น้อย ดังนั้นการจำกัดแหล่งไนโตรเจนจึงมีค่าที่เหมาะสมอยู่ คือ มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 23 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน ซึ่งถ้าน้อยเกินไป

หรือไม่มีเลยจึงไม่มีการเจริญหรือการเจริญลดลง ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกใช้ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร

5.3.3 การศึกษาผลของการจำกัดปริมาณแมกนีเซียม

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) รายงานว่า ผลของการจำกัดแมกนีเซียมในรูปแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดยเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ต่อมาภายหลังจัดจำแนกสปีชีส์เป็น *Alcaligenes eutropha* และเป็น *Ralstonia eutropha* และในปัจจุบันคือ *Cupriavidus necator* พบว่า อาหารที่ไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตจะทำให้ปริมาณ P(3HB) เพิ่มขึ้นจาก 19.86 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเทียบกับอาหารสูตรที่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร จะสามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้เท่ากับ 37.70 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

งานวิจัยในขั้นตอนนี้ศึกษาผลของการจำกัดปริมาณแมกนีเซียมในรูปของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ต่อการผลิต P(3HB) โดยเปรียบเทียบการผลิต P(3HB) เมื่อใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 0.2 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต โดยใช้ปริมาณคาร์บอนและยูเรียที่ได้จากการทดลองข้างต้น คือ 30 และ 0.8 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วนสารอื่นใช้ในปริมาณเท่าเดิม (สูตรอาหาร MSM) พบว่าเมื่อใช้อาหาร MSM ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 47.26 และ 43.50 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต เชื้อสามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้สูงสุด โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 9.23 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 4.60 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 49.96 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารอาหารที่จำเป็นในการเจริญอาจมีปริมาณไม่เพียงพอสำหรับการเจริญได้ตามปกติ เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะเช่นนี้อาจถือได้ว่าอยู่ในภาวะที่มีสารอาหารไม่สมดุล จึงกระตุ้นให้เซลล์สร้างสารที่สามารถเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้เพื่อให้เซลล์มีชีวิตอยู่รอด ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) แต่เชื้อจุลินทรีย์เป็นเชื้อต่างชนิดกัน ดังนั้นจึงพิจารณาให้ไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตในการทดลองขั้นต่อไป

5.3.4 การศึกษาผลร่วมของการจำกัดโพแทสเซียมและฟอสเฟต

Daniel และคณะ(1992) รายงานว่า การศึกษาการจำกัดปริมาณฟอสเฟตมีผลต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดยเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* Z-I ในระดับถังหมัก พบว่าเมื่อจำกัดปริมาณฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีปริมาณเพียง 45 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณฟอสเฟตในสูตรอาหารเดิม ปริมาณ P(3HB) จะเพิ่มขึ้นจาก 9.9 เป็นเท่ากับ 23 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

Sharma และ Mallick (2005) รายงานว่า การจำกัดปริมาณฟอสเฟตมีผลต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดยเชื้อ *Nostoc muscorum* ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรีย พบว่าในภาวะที่ขาดแคลนฟอสเฟตและมีแหล่งคาร์บอนจากภายนอกเซลล์ คือ อะซิเตต กลูโคส มอลโตส ฟรุกโตสและเอทานอลจะทำให้มีการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) เพิ่มสูงขึ้น และจากผลการวิจัยพบว่าเมื่อเติมอะซิเตต 0.2 เปอร์เซนต์ *Nostoc muscorum* สามารถผลิต P(3HB) เพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ 35 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 7 วัน

งานวิจัยในขั้นตอนนี้ศึกษาผลของการจำกัดโพแทสเซียมและฟอสเฟตในรูปของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ต่อการผลิต P(3HB) โดยเปรียบเทียบการผลิต P(3HB) เมื่อใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โดยใช้ปริมาณคาร์บอน ยูเรียและแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตที่ได้จากการศึกษาข้างต้น คือ 30 0.8 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ตามลำดับ ส่วนสารอื่นใช้ในปริมาณเท่าเดิม (สูตรอาหาร MSM) พบว่าเมื่อใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร *B. megaterium* BA-019 สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้สูงสุด โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 9.21 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 4.62 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 50.12 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง เมื่อใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นลดลง คือ 1.5 1.0 0.5 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต พบว่าได้ปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 46.60 41.48 39.81 และ 42.59 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และเมื่อใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเพิ่มขึ้น คือ 2.5 และ 3.0 กรัมต่อลิตร พบว่าได้ปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 44.45 และ 38.36 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตรสำหรับการศึกษาต่อไป

5.4 การผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) ที่ศึกษาได้ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

5.4.1 การผลิต P(3HB) จากน้ำอ้อย

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของการผลิต P(3HB) จากการใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ภาวะที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าไปเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่า ได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 9.61 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 3.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 42.52 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 6 ชั่วโมง จึงเห็นได้ว่าการเลี้ยงเชื้อในถังหมักซึ่งสามารถจัดภาวะต่างๆได้ดีกว่าในระดับขวดเขย่า เช่น ให้ปริมาณอากาศได้สูงกว่า มีการปั่นกวนด้วยใบกวนทำให้มีการผสมได้ดี ทำให้เซลล์สามารถเจริญค่อนข้างดีกว่า แต่ปริมาณ P(3HB) ใกล้เคียงกัน ซึ่งถ้ามีการศึกษาวิจัยต่อก็ควรจะมีการศึกษาปัจจัยบางประการที่อาจมีผลต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) เช่น การควบคุมค่าความเป็นกรดด่างตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ค่าปริมาณออกซิเจนละลาย รวมทั้งการเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งกะ(fed-batch cultivation) โดยมีการเติมสารอาหาร เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ในช่วงการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เป็นต้น ส่วนผลการเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่ดีกว่าการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าในการศึกษานี้คือ การสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้สูงสุดใช้เวลาสั้นกว่าการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า โดยพบว่าที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ ให้ค่าอัตราการผลิตในถังหมักมีค่าเท่ากับ 0.51 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าในระดับขวดเขย่าที่มีค่าเท่ากับ 0.38 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

5.4.2 การผลิต P(3HB) จากกากน้ำตาล

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของการผลิต P(3HB) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ภาวะเช่นเดียวกับข้อ 5.4.1 แต่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำอ้อย พบว่า ได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 9.97 กรัมต่อลิตรซึ่งสูงกว่าเมื่อใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ได้ค่าความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 3.31 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 33.23 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 15 ชั่วโมง ซึ่งต่ำกว่าการใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนและเวลาที่ได้ P(3HB) สูงสุดช้ากว่าเมื่อใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน

จากผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต P(3HB) จากการใช้น้ำอ้อยและกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 5 ลิตร สรุปว่าเมื่อใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าได้ปริมาณ P(3HB) และค่าอัตราการผลิต (productivity) สูงกว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกากน้ำตาลเป็นของเหลือที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทราย อาจจะมีสิ่งเจือปน (impurity) ที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ ทำให้จุลินทรีย์นำมาใช้ได้ยากกว่าน้ำอ้อยที่มีความบริสุทธิ์มากกว่า นอกจากนี้ในองค์ประกอบของกากน้ำตาลมีโลหะหนักอยู่หลายชนิด (Teclu และคณะ, 2009) ซึ่งอาจเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์และสะสม P(3HB)

การใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตสารผลิตภัณฑ์ มีข้อดีคือ น้ำอ้อยมีความบริสุทธิ์สูง การเตรียมก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก (pretreatment) มีเพียงเล็กน้อย ที่สำคัญคือเป็นส่วนที่ได้จากต้นกระบวนการของการผลิตน้ำตาลทราย ซึ่งจัดว่าเป็นการประหยัดพลังงาน (energy saving) ถ้าเปรียบเทียบกับน้ำตาลทราย (รูปที่ 2.8) และเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ การแยกและทำบริสุทธิ์ของสารผลิตภัณฑ์ทำได้ง่าย ใช้ขั้นตอนน้อยกว่าเนื่องจากไม่มีสี รวมทั้งการบำบัดของเหลือทิ้งจากน้ำหมัก (effluent treatment) ก็ทำได้ง่ายและสะดวก และในกรณีการใช้กากน้ำตาลแม้จะพิจารณาว่ามีราคาถูก แต่ในปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารมีความต้องการกากน้ำตาลเป็นปริมาณมากขึ้นตามลำดับ ดังนั้น ราคาจึงสูงขึ้นกว่าแต่ก่อน นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาปัจจัยอื่นๆ พบว่ามีข้อด้อยกว่า ได้แก่ ก่อนนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ จะต้องมีขั้นตอนทำบริสุทธิ์หลายขั้นตอน (ขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์) ได้แก่ การทำให้เจือจาง ตามด้วยการแยกส่วนกากตะกอนที่เป็นของแข็ง (solid particles) การบำบัดสี (decolorization) ถ้าจำเป็นในบางกระบวนการ รวมทั้งการกำจัดโลหะหนัก เช่น อะลูมิเนียม อะซินิด คอปเปอร์ เหล็ก แมงกานีส สังกะสี เป็นต้น (ซึ่งอาจจำเป็นในการผลิตผลิตภัณฑ์บางชนิด) เนื่องจากโลหะหนักบางชนิด อาจเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการผลิต แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และชนิดของสารผลิตภัณฑ์ด้วย ซึ่งกระบวนการเหล่านี้ทำให้กากน้ำตาลซึ่งจัดว่ามีราคาต่ำ มีราคาต้นทุนสูงขึ้น นอกจากนี้ การทำผลิตภัณฑ์ที่ได้ให้บริสุทธิ์ ถ้าผลิตภัณฑ์อยู่ในน้ำหมักก็จะทำได้ยากกว่า เนื่องจากการมีสารปนเปื้อนในกากน้ำตาล รวมถึงการบำบัดของเหลือทิ้ง เมื่อสิ้นสุดกระบวนการจะทำได้ยากกว่า

คณะผู้วิจัยได้ใช้วัตถุดิบหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 มาก่อนการศึกษานี้แล้ว รวมทั้งกำลังศึกษาวิจัยอยู่ โดยรัตนศิริ มุทิตากุล (2538) เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลซูโครส น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลทรายแดงเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า *B. megaterium* BA-019 สามารถผลิต P(3HB) ได้สูงสุด 14.24 15.11 19.12 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM โดยใช้กากน้ำตาลปริมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถผลิต P(3HB) ได้ดีกว่าการใช้น้ำตาลชนิดอื่น โดยสามารถผลิต P(3HB) ได้สูงสุด 31.84 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 24 ชั่วโมง และพบว่าเมื่อมีการเติมสารทวีน 80 ซึ่งเป็นสาร dissociating agent ปริมาณ 2.5 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหาร MSM มีผลทำให้ *B. megaterium* BA-019 มีการสร้าง P(3HB) เพิ่มมากขึ้นถึง 47.48 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 36 ชั่วโมง และต่อมาได้มีการวิจัยโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 อติพล บุญเรืองถาวร (2543) รายงานว่า *B. megaterium* BA-019 สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้สูงสุด โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 8.51 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 5.14 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณเท่ากับ 60.40 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 36 ชั่วโมง ค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.14 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยทั้งหมดทำการวิจัยในระดับขวดเขย่าและพบว่าปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้มีปริมาณแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ กากน้ำตาลที่ใช้ในการผลิต เป็นต้น ซึ่งกากน้ำตาลในแต่ละครั้งมีความแตกต่างกันขึ้นกับหลายปัจจัย ได้แก่ ฤดูกาล สภาพดิน การเก็บรักษาและกรรมวิธีการผลิตของโรงงาน เป็นต้น แต่ในขอบเขตของงานวิจัยนี้เป็นการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 โดยใช้น้ำอ้อยซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้โดยคณะผู้วิจัย และจากเหตุผลดังที่กล่าวมาจึงต้องการศึกษาการใช้น้ำอ้อยในการเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิต P(3HB) เพื่อให้ได้ข้อมูลในด้านต่างๆ จึงศึกษาในระดับขวดเขย่าซึ่งเป็นการทดลองที่ทำได้สะดวก ไม่ยุ่งยาก และศึกษาปัจจัยที่จำเป็นได้หลายประการ ได้แก่ การเจริญของจุลินทรีย์ *B. megaterium* BA-019 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้ และอัตราการผลิต ซึ่งจะได้นำมาพิจารณาในการศึกษาการเลี้ยงเชื้อระดับขยายส่วนต่อไป โดยในการวิจัยต่อไปควรเป็นการเลี้ยงเชื้อในถังหมักโดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำอ้อยและแหล่งไนโตรเจนเป็นยูเรีย โดยจำกัดธาตุอาหารที่มีผลต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดย *B. megaterium* BA-019 ที่ศึกษาได้จากงานวิจัยนี้ และอาจมีการเติมสารอาหารเป็นครั้งคราว (fed-batch cultivation) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะทำให้ได้ปริมาณ P(3HB) สูงเพิ่มขึ้นอีก

ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบการผลิต P(3HB) โดยใช้จุลินทรีย์และเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน

Strain	Carbon substrate	cultivation time (h)	Culture mode	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% DCW)	productivity (g/l-h)	Reference
B. megaterium BA-019	Sugarcane liquor	12	Batch (Shake flask)	9.21	4.62	50.12	0.38	งานวิจัยนี้
B. megaterium BA-019	Sugarcane liquor	6	Batch(Fermenter)	9.61	3.07	42.52	0.51	งานวิจัยนี้
B. megaterium BA-019	Molasses	15	Batch (Fermenter)	9.97	3.31	33.23	0.22	งานวิจัยนี้
B. megaterium BA-019	Molasses	24	Batch (Shake flask)	5.75	2.73	47.48	0.08	รัตนศิริ มุทิตากุล, 2538
B. megaterium BA-019	Molasses	36	Batch (Shake flask)	8.51	5.14	60.40	0.14	อติพล บุญเรืองถาวร, 2543
B. megaterium	Molasses	48	Batch (Fermenter)	3.60	2.20	59.40	0.08	Gouda et al. (2001)
Pseudomonas cepacia	Lactose	120	Batch (Fermenter)	3.57	2.00	56.00	0.02	Young et al. (1994)
Azotobacter chroococcum	Starch	58	Batch (Fermenter)	1.17	0.86	73.90	0.01	Kim (2000)
Pseudomonas fluorescens A2a5	Sugarcane liquor	96	Batch (Fermenter)	32.00	22.00	70.00	0.23	Jiang et al. (2008)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย