หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน คือ ฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4) จะพบว่าเซลล์สามารถผลิต PHB ไปควบคู่กับการเจริญและการสังเคราะห์โปรตีน ภายหลังที่การเจริญและการสังเคราะห์โปรตีนสิ้นสุดลงเซลล์ยังคงมีการผลิตและสะสม PHB เพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ซึ่งถือเป็นระยะการสะสม PHB (storage phase) โดยพบการสะสม PHB ประมาณ 13 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งที่เวลา 60-70 ชั่วโมง เมื่อใช้เซลล์ *A.eutrophus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันเป็นเชื้อตั้งต้น เมื่อพิจารณาความสามารถในการใช้แหล่งต้นตอไนโตรเจนและคาร์บอน พบว่าปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตจะลดลงอย่างรวดเร็วในขณะที่การเจริญและการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์เพิ่มขึ้นจนกระทั่งอัตราการลดลงจะช้าลงเมื่อเซลล์เจริญจนถึงระยะคงที่ (50-70ชั่วโมง) ซึ่งการสังเคราะห์โปรตีนคงที่เช่นกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนเพื่อการสังเคราะห์โปรตีนโดยตรง จากรายงานของ Heinzle และ Lafferty (1980) และ Groom และคณะ (1988) พบว่าปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตจะถูกใช้ไปหมดภายใต้สภาวะของการเพาะเลี้ยงที่มีการรักษาระดับพีเอชเท่ากับ 7.0 แต่ผลจากการทดลองพบว่ามีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเหลืออยู่ประมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร อาจเนื่องจากว่าในการทดลองนี้ไม่ได้มีการควบคุมพีเอชของการเลี้ยงเชื้อให้มีค่าคงที่ตลอดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเมื่อเทียบกับสภาวะข้างต้น

มีรายงานว่า *A.eutrophus* สามารถใช้เมธานอล, กลูโคสและก๊าซไฮโดรเจน, คาร์บอนไดอ๊อกไซด์หรืออากาศ (air) เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Byrom, 1987)

เมื่อศึกษาชนิดของแหล่งต้นตอคาร์บอนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรอุดม (NB) แล้วทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วย เมธานอล, เอธานอล, กรดอะซิติค, กลูโคส หรือ ซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 4) สังเกตพบว่าเซลล์จะมีลักษณะเป็นเมือก มีการเกาะกันเป็นกลุ่มแตกต่างไปจาก

การเพาะเลี้ยงเมื่อมีฟรุกโตส ทั้งนี้อาจจะเป็นไปได้ว่าสารต้นตอคาร์บอนที่ใช้ไม่เหมาะสมที่จะส่งเสริมการเจริญของเซลล์ ดังนั้นเซลล์จึงจำเป็นต้องมีการปรับสภาวะเพื่อรักษาความมีชีวิตของเซลล์ก็เป็นได้ และเมื่อเปรียบเทียบค่าการเจริญ (A_{436}) จะเห็นว่าเซลล์สามารถเจริญในกลูโคสได้ดีที่สุด แต่สามารถสังเคราะห์ PHB ได้น้อยมากและระดับของ PHB ที่สังเคราะห์ไม่มีความแตกต่างกับการเพาะเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ ซึ่งต่ำกว่าการสังเคราะห์ เมื่อใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน (ประมาณ 15 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง)

ผลการติดตามรูปแบบการเจริญและการผลิต PHB ของเซลล์ *A.eutrophus* เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะเช่นเดียวกับรูปที่ 4 แต่ใช้อาหารสูตรอุดมเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อตั้งต้น (รูปที่ 5) พบว่าเซลล์สามารถเจริญเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดที่เวลาสั้นและให้ปริมาณ PHB สูงกว่า (15-16 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งที่เวลา 40 ชั่วโมง) ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์ซึ่งมีการเจริญเต็มที่ใน NB ก่อนจะเข้าสู่ระยะการสังเคราะห์ PHB (PHB production phase) ได้โดยตรง Sonnleitner และคณะ (1979) ได้ศึกษาจลนศาสตร์ของการสังเคราะห์ PHB ในจุลินทรีย์ 2 ชนิดคือ *A.eutrophus* H16 และ *Mycoplana rubra* R14 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงการเจริญ และการสังเคราะห์ PHB เป็น 3 ระยะคือ ระยะของการเจริญ (exponential cell growth) ซึ่งควบคู่ไปกับการสังเคราะห์ PHB ระยะของการเพิ่มปริมาณ PHB ในขณะปริมาณโปรตีนและองค์ประกอบของเซลล์คงที่และระยะที่มีการสะสมปริมาณ PHB สูงสุด

เนื่องจากสภาวะที่จะส่งเสริมให้มีการสังเคราะห์ PHB ได้แก่ สภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนเหลืออยู่มากเกินพอจึงได้แปรผันปริมาณฟรุกโตสที่เหมาะสมกับการผลิต PHB เป็น 20 และ 40 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 5) พบว่า *A.eutrophus* ATCC 17697 สามารถเจริญในอาหารที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตรได้ดี และการเจริญในอาหารที่มีฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตรจะส่งเสริมให้มีการสังเคราะห์ PHB ได้สูงกว่าเมื่อใช้ฟรุกโตส 40 กรัมต่อลิตร เล็กน้อยซึ่งสอดคล้องกับที่ Mulchandani และคณะ (1989) รายงานว่า ค่าดัชนีของการเจริญ (growth index,μ) ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 จะขึ้นกับอัตราส่วนระหว่างปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (แหล่งไนโตรเจน) กับฟรุกโตส (แหล่งคาร์บอน) โดยที่อัตราการเจริญจะสูงขึ้นเมื่ออัตราส่วนของปริมาณไนโตรเจนต่อคาร์บอนเพิ่มขึ้น และจะมีค่า μ สูงสุดที่อัตราส่วนระหว่างปริมาณไนโตรเจนต่อคาร์บอนอยู่ในช่วงระหว่าง 0.12-0.16 หลังจากนั้นจะมีค่าลดลงเมื่ออัตราส่วนระหว่างปริมาณไนโตรเจนต่อคาร์บอนสูงขึ้นเชื่อว่าอาจเนื่องมาจากเกิดสภาวะของการยับยั้งด้วยสารตั้งต้น (substrate inhibition) ดังนั้นจึงเป็นการสนับสนุนผลการทดลองเนื่องจากปริมาณฟรุกโตส 20 และ 40 กรัมต่อลิตร (แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร) จะมีอัตราส่วนระหว่างปริมาณไนโตรเจนต่อคาร์บอนเท่ากับ 0.1 และ 0.05 ตามลำดับ

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วย กลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน (รูปที่ 6) จะพบว่าในช่วงแรกของการเจริญเซลล์ไม่สามารถใช้กลูโคสได้ จึงยังไม่สามารถเจริญและสังเคราะห์โปรตีนได้แต่ในสภาวะที่เซลล์เริ่มใช้กูลโคสได้ (หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 90-100 ชั่วโมง) รูปแบบการเจริญ และการสังเคราะห์ PHB แตกต่างจากเมื่อใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน โดย PHB จะถูกสังเคราะห์ขึ้นก่อนจนสูงสุดในชั่วโมงที่ 100-110 ในขณะที่เซลล์ยังไม่เจริญและสังเคราะห์โปรตีน โดยที่กลูโคสและแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มลดลงในขณะที่การสะสม PHB ก็ลดลงอย่างรวดเร็วด้วยทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์ *A.eutrophus* สามารถใช้ PHB เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเริ่มต้นเพื่อเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องทำให้เซลล์สามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ต่อไป Doi และคณะ (1989) รายงานว่ามีการสะสมโพลีฟอสเฟต (polyphosphate) ซึ่งเกิดขึ้นพร้อมกับการสังเคราะห์ PHB ใน *A.eutrophus* H16 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน (nitrogen-free medium) และภายใต้สภาวะที่เซลล์ขาดคาร์บอนและฟอสเฟตเป็นเวลา 72 ชั่วโมงเมื่อมีออกซิเจนจะมีการย่อยสลาย PHB อย่างรวดเร็วแล้วปลดปล่อยไฮดรอกซีบิวทิเรท (3HB) และอะซิเตทออกนอกเซลล์โดยที่ปริมาณของโพลีฟอสเฟตไม่เปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในสภาวะที่ขาดสารอาหาร (nutrient starvation) PHB จะช่วยลดอัตราการสลายองค์ประกอบของเซลล์บางชนิด อาทิเช่น RNA และโปรตีน ให้เกิดขึ้นได้ช้าลง (Dawes และ Anderson, 1990 อ้างอิงจาก Dawes และ Senior, 1973 ; Dawes, 1985)

จากการตรวจเอกสารพบว่าสภาวะที่จำกัดออกซิเจนจะส่งเสริมให้มีการสังเคราะห์ PHB สูงขึ้น (Page และ Knosp, 1989) จึงทำการทดลองเพื่อศึกษาผลของปัจจัยดังกล่าว โดยแปรผันปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรฟลาสก์ (CVF) (รูปที่ 7) และพบว่าปริมาณ PHB จะเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราการให้อากาศ (aeration rate) ลดลงเพียง 2 เท่าเทียบกับ CVF 10 เปอร์เซนต์และแม้ว่าจะลดอัตราการให้อากาศลงโดยการเพิ่ม CVF เป็น 30, 40 และ 50 เปอร์เซนต์ อัตราการสังเคราะห์ PHB และประสิทธิภาพของการใช้ฟรุกโตสเพื่อสังเคราะห์ PHB จะไม่สูงขึ้น ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดลองการจำกัดออกซิเจนไม่จำเป็นสำหรับประสิทธิภาพของการใช้ฟรุกโตสและการสังเคราะห์ PHB ของ *A.eutrophus* ATCC. 17697 จากรายงานของ Page และ Knosp (1989) พบว่าที่ CVF 40-50 เปอร์เซนต์ ประสิทธิภาพของการใช้กลูโคสและปริมาณ PHB จะมีค่าสูงสุดใน *Azotobacter vinelandii* สายพันธุ์ดั้งเดิมในขณะที่การเพิ่ม CVF ไม่ส่งเสริมการสังเคราะห์ PHB แต่มีผลต่อประสิทธิภาพของการใช้กลูโคสเพื่อสังเคราะห์ PHB ใน *A.vinelandii* UWD

นอกจากปัจจัยที่กล่าวข้างต้นแล้วสภาวะที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนก็จะมีผลต่อการสังเคราะห์ PHB ด้วยเช่นกัน (Suzuki และคณะ, 1986) จากผลการทดลองรูปที่ 8 พบว่าในอาหารที่ประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 และ 0.5 กรัมต่อลิตร จะส่งเสริมให้มีการสังเคราะห์ PHB ได้ปริมาณสูงสุดคิดเป็น 30 และ 37 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ ในขณะที่แอมโมเนียมซัลเฟต 0 และ 1.0 กรัมต่อลิตร มีการสังเคราะห์ PHB สูงสุดเพียง 6-7 และ 13-14 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าการมีแอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณน้อยจะสามารถเพิ่มปริมาณ PHB ได้สูงกว่าสภาวะที่ขาดหรือมีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตมาก Suzuki และคณะ (1986) ได้ศึกษาผลของปริมาณไนโตรเจนต่อการผลิต PHB จาก *Protomonas extorquens* sp.K ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch และรายงานว่าเมื่อใช้สารละลายแอมโมเนีย (33% ammonia water) ในอัตรา 0.02-0.08 กรัมแอมโมเนียต่อชั่วโมงจะผลิต PHB ได้สูงถึง 60 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง แต่เมื่อเพิ่มอัตราการให้สารละลายแอมโมเนีย เป็น 0.26-0.53 กรัมแอมโมเนียต่อชั่วโมง การสังเคราะห์ PHB จะลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าภายใต้สภาวะที่ขาดไนโตรเจนอย่างสมบูรณ์ แอคติวิตีของการสังเคราะห์ PHB ของเซลล์จะถูกทำลายหมดสิ้นไป

จากการติดตามการเจริญและการสังเคราะห์ PHB ในอาหารสูตรอุดม (รูปที่ 9) จะพบความสัมพันธ์ในลักษณะผกผันระหว่างการผลิต PHB กับการสังเคราะห์โปรตีน กล่าวคือระดับการสังเคราะห์ PHB จะลดลงอย่างรวดเร็วในขณะที่เซลล์มีการเจริญและสังเคราะห์โปรตีนเพิ่มขึ้น และที่ชั่วโมง 18 ซึ่งการสังเคราะห์โปรตีนสูงสุดจะพบ PHB ภายในเซลล์เพียงเล็กน้อย (เกือบวิเคราะห์ไม่พบ PHB) เนื่องจากในสภาวะของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรอุดม ซึ่งประกอบด้วยสารสกัดจากเนื้อวัว (beef extract) และโปรตีนไฮโดรไลเสตเปปโตน (peptone) ซึ่งเป็นสารต้นตอไนโตรเจนอินทรีย์ (organic nitrogen) เซลล์จึงเข้าสู่วิถีของการสังเคราะห์โปรตีนได้ง่าย ดังนั้น จึงอาจเป็นไปได้ว่าในสภาวะที่มีสารอาหารสมดุลย์ เซลล์จะมีขบวนการเมตาโบลิซึมเพื่อสร้างพลังงานและสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ (cell materials) โดยข้ามกระบวนการสังเคราะห์ PHB แต่ในสภาวะที่ไม่สมดุลย์การสังเคราะห์และสะสม PHB จะเกิดขึ้นเพื่อชดเชยการสร้างและสะสมพลังงานในรูปของ ATP

จากผลการทดลองข้อ 3.3 ที่ได้ยืนยันว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นในอาหารสูตรอุดมจะอิทธิพลต่อการสังเคราะห์ PHB เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารและสภาวะที่เหมาะสมของสูตรผลิต PHB และจากผลการทดลองที่ใช้อาหารสูตรอุดมเพาะเลี้ยงเซลล์ *A.eutrophus* (ข้อ 3.7) จะเห็นได้ว่าเซลล์ที่เจริญในอาหารสูตรอุดมจะเจริญและเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดได้รวดเร็ว ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาผลของการผลิต PHB ในอาหารที่ผสมระหว่างสูตรเกลือแร่กับสูตรอุดม (NB)

(รูปที่ 10) จะเห็นว่าการเจริญของเซลล์ในสภาวะนี้จะมีลักษณะและรูปแบบของการเจริญแบ่งเป็น 2 ช่วงคือ ช่วงแรกจะเป็นการเจริญเมื่อเซลล์มีการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนจากอาหารสูตรอุดม (NB) เป็นส่วนใหญ่และนอกจากนี้ยังใช้แหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟตเพิ่มอีกด้วย (แอมโมเนียมซัลเฟตลดลงเกือบ 50 เปอร์เซนต์) โดยที่เซลล์แทบจะไม่มีการใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเลย หลังจากนั้นในช่วงที่สองซึ่งเซลล์เจริญอย่างรวดเร็วมาก และมีค่าความขุ่น ($A_{436} \tilde{}$ 20 หน่วย) สูงประมาณ 8 และ 2 เท่าของเมื่อเจริญในอาหารสูตรอุดมและสูตรเกลือแร่เดี่ยว ๆ ตามลำดับ (ชั่วโมงที่ 20) จะเริ่มใช้ฟรุกโตสโดยปริมาณจะลดลงอย่างรวดเร็วควบคู่กับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและเข้าสู่การเจริญสูงสุดในเวลาประมาณ 40-50 ชั่วโมงโดยให้ค่าการสังเคราะห์โปรตีนเพิ่มขึ้นอีกประมาณ 2 เท่า เมื่อพิจารณารูปแบบของการสังเคราะห์ PHB จะเห็นได้ว่าในระหว่างที่เซลล์เจริญในช่วงแรกจะมีการสังเคราะห์ PHB เพิ่มขึ้น แต่อัตราของการสังเคราะห์จะช้ามากและเกือบไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะการสังเคราะห์โปรตีนสูงสุด และปริมาณของ PHB สูงสุดจะต่ำกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่เดี่ยว ๆ เกือบ 3 เท่า ผลการทดลองดังกล่าวนี้จึงเป็นการยืนยันอีกครั้งว่าในสภาวะของการเจริญปกติที่มีแหล่งต้นตอคาร์บอนและไนโตรเจนสมบูรณ์ เซลล์ *A.eutrophus* จะมีการสังเคราะห์ PHB ต่ำ และการเปลี่ยนแปลงนี้สามารถทำให้เกิดขึ้นได้ง่ายภายในระยะเวลาอันสั้น ในขณะเดียวกันกลไกการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์ใดที่เป็นวิถีที่เซลล์เลือกให้เป็นวิถีสำคัญ (major) ในสภาวะของการใช้อาหารที่เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนและไนโตรเจนที่แตกต่างกัน จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะติดตามการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เป็นกุญแจสำคัญในการใช้และควบคุมเมตาบอลิซึมของเซลล์ในสภาวะที่แตกต่างกัน

ในการวิจัยนี้ได้เลือกศึกษาเอนไซม์เป้าหมายที่ได้รับการเสนอตามสมมติฐานของ Oeding และ Schlegel (1973) ; Senior และ Dawes (1973) ได้แก่ เบต้า-คีโตไธโอเลส, อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส และไฮดรอกซีบิวทิเรทไฮโดรจีเนส ส่วน PHB-ซินทิเตสนั้น วิธีการวิเคราะห์ค่อนข้างยุ่งยากจะต้องอาศัยวิธีการทางเรดิโอแอคติวิตี (radioactivity) (Haywood และคณะ, 1989) การศึกษาเอนไซม์เริ่มต้นจากการหาวิธีการสกัดแยกเอนไซม์จากเซลล์ โดยในการทดลองนี้ใช้สารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.2 ที่เสริมด้วยแมกนีเซียมคลอไรด์ 5.0 มิลลิโมลาร์, อีดีทีเอ 1.0 มิลลิโมลาร์, ไดไธโอไธรทอล 1.0 มิลลิโมลาร์ และกลีเซอรอล 1.0 โมลาร์ (Slater และคณะ, 1988) ไดไธโอไธรทอลนั้นจะเป็นสารประกอบ thiol ซึ่งจะป้องกันการออกซิเดชันของหมู่ sulfhydryl ที่บริเวณเร่ง (active sites) ของเอนไซม์ ส่วนอีดีทีเอจะเป็นสารที่เข้าไปคีเลต (chelate) พวก counterion และกลีเซอรอลจะช่วยเพิ่มความเสถียรของ

เอนไซม์โดยไปล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีน เพิ่มความหนืดให้กับสารละลายจึงลดการเปลี่ยนแปลงโครงร่าง (conformation) ของโปรตีน นอกจากนี้จะไปช่วยลดการละลายของออกซิเจนในสารละลาย ซึ่งเป็นการหลีกเลี่ยงปฏิกิริยาออกซิเดชั่นอีกด้วย ในขณะที่แมกนีเซียมคลอไรด์จะช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในสารสะลายปฏิกิริยา (Griebel และคณะ, 1968)

วิธีการแยกเอนไซม์จากเซลล์เลือกใช้วิธีการทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) เนื่องจากเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการเตรียมเอนไซม์ปริมาณน้อย และเลือกวิเคราะห์เอนไซม์ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนสเป็นตัวนำ (pilot) ทั้งนี้เนื่องจากวิธีการวัดปริมาณทำได้ง่ายและสารตั้งต้นมีราคาถูกกว่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์ทั้งสองชนิด โดยหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกเอนไซม์ออกมาจากเซลล์ให้ได้มากที่สุด เพื่อเป็นการเพิ่มความไวและความถูกต้องของการวัด (รูปที่ 14) พบว่าสภาวะการใช้เครื่องที่ 50% duty cycle, output 3 เป็นเวลานาน 8 นาที โดยมีปริมาตรของสารละลายเซลล์ 8-10 มิลลิลิตร จะแยกเอนไซม์ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนสออกมาอยู่ในส่วนสารละลายใส มีค่าแอคติวิตีรวม (1.60 หน่วย) และแอคติวิตีจำเพาะ (0.144 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) สูงสุดและคงที่

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบลักษณะการผลิตเอนไซม์ทั้งสามชนิดของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ในสภาวะของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่มีแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน คือ ฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 15) พบว่าการผลิตเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลสจะสูงขึ้นตามปริมาณการเพิ่มการสังเคราะห์ PHB ในช่วงของการเจริญทวิคูณ (log phase) และจะลดลงในระยะการเจริญสูงสุด (stationary phase) อาจเป็นไปได้ว่าในช่วงการเจริญทวิคูณเซลล์จะใช้ฟรุกโตสเพื่อสังเคราะห์อะซิติลโคเอนไซม์เอ ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์ของวัฏจักรเครปส์และสารตั้งต้นของวิถีการสังเคราะห์ PHB แต่ในสภาวะของการเพาะเลี้ยงซึ่งส่งเสริมให้มีการผลิต PHB ส่วนหนึ่งของอะซิติลโคเอนไซม์เอจึงถูกส่งเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ PHB Oeding และ Schlegel (1973) รายงานว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลสจะขึ้นกับสารเมตาบอไลซ์ (metabolites) ส่วนแอคติวิตีของเอนไซม์อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตสซึ่งมีค่าสัมพันธ์และแปรตามกับเบต้า-คีโตไธโอเลส เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดี-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอจากอะซิโตอะซิติลโคเอ ซึ่งสังเคราะห์จากเบต้า-คีโตไธโอเลส Ploux และคณะ (1988) ได้ทำการโคลนยีนของเอนไซม์ทั้งสองชนิดใน *Z.ramigera* และพบว่ายีนซึ่งควบคุมรหัส (structural gene) ของอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตสจะอยู่บนกลุ่ม (cluster) เดียวกันกับเบต้า-คีโตไธโอเลสในลักษณะของ downstream ซึ่งมีผลให้การแสดงออก โดยพิจารณาจากรูปแบบการสังเคราะห์เอนไซม์ทั้งสองชนิดจึงสอดคล้องกัน

ส่วนรูปแบบการผลิตเอนไซม์ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนสที่ลดลงเมื่อปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นและในระยะที่ PHB สังเคราะห์สูงสุด จะไม่พบแอคติวิตีของไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส อาจเนื่องจากในสภาวะดังกล่าว เซลล์จะลดการย่อยสลาย PHB เพื่อนำไปใช้ในขบวนการเมตาโบลิซึม

เพื่อให้การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตเอนไซม์เป้าหมายในวิถีการสังเคราะห์กับปริมาณ PHB กระจ่างและชัดเจนยิ่งขึ้นจึงเลือกสภาวะที่เซลล์ *A.eutrophus* สังเคราะห์ PHB ได้สูงอีกสภาวะหนึ่งแล้วติดตามรูปแบบการผลิตเอนไซม์จากการทดลอง (รูปที่ 16) พบว่าที่สภาวะของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนคือฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัมต่อลิตร การสังเคราะห์เอนไซม์จะมีรูปแบบคล้ายคลึงกับสภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร กล่าวคือ การผลิตเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลสและอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตสจะสูงขึ้นเมื่อการสังเคราะห์ PHB เพิ่มขึ้นในระยะการเจริญทวิคูณและจะลดลงและคงที่เมื่อปริมาณ PHB คงที่ และในระยะที่มีการสังเคราะห์ PHB ได้สูงสุด ปริมาณ PHB ที่สะสมภายในเซลล์เพิ่มขึ้น 2 เท่า จะพบแอคติวิตีจำเพาะของเบต้า-คีโตไธโอเลสและอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตสเพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่า และ 2 เท่าตามลำดับ

ดังนั้นเอนไซม์ทั้งสองชนิดจึงน่าจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงปริมาณการสังเคราะห์ PHB Peoples และ Sinskey (1989) ได้เสนอแนะว่า เอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลสและอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส เป็น constitutive ซึ่งอยู่ร่วมภายในระบบของยีน ของ *A.eutrophus* และจำเป็นจะต้องมีการทำงานของยีน phbC ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ PHB polymerase และอยู่บนยีนกลุ่มเดียวกันกับ phbA - phbB (ยีนสำหรับเบต้า-คีโตไธโอเลสและอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส ตามลำดับ) ในลักษณะ upstream ในลักษณะที่เหมาะสมจึงจะมีการแสดงออกของยีน phbA - phbB ในลักษณะเดียวกันเซลล์จะไม่สามารถผลิต PHB ได้ถ้าปราศจากการแสดงออกของยีน phbA - phbB เนื่องจาก PHB polymerase จะไม่มีความเสถียร (instability) ซึ่งสอดคล้องกับสมมติฐานที่ว่าในสภาวะที่ไม่มีสารตั้งต้น PHB polymerase สมบัติจะเสียไปและถูกย่อยสลาย (degrade)ในที่สุด

ส่วนรูปแบบการผลิตเอนไซม์ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส จะพบว่ามีค่าคงที่ตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงและมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น 9 เท่า เมื่อพิจารณาวิถีการสังเคราะห์ PHB ตามสมมติฐานของ Oeding และ Schlegel, 1973 ; Senior และ Dawes, 1973 ในสภาวะที่เป็น in vivo อาจพิจารณาได้ว่าในสภาวะที่ไม่ส่งเสริมการเจริญแต่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ PHB เซลล์จำเป็นจะต้องมีการย่อยสลาย PHB เพื่อนำไปใช้ในขบวนการเมตาบอลิซึม

เช่นเดียวกับที่ Slater และคณะ (1988) รายงานว่าในสภาพที่มีการจำกัดสภาวะแวดล้อม (environmental limitation) PHB จะทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมคาร์บอนและพลังงาน (carbon and energy sink) ซึ่งเป็นศูนย์กลางให้แก่ขบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ (cellular process) หรืออาจเป็นไปได้ว่าอะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์ที่มีปริมาณสูง (จากการทำงานของเบต้า-คีโตไธโอเลส) จะเปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิเตทโดยการทำงานของเอนไซม์ 3 -กรดคีโต-โคเอทรานสเฟอเรส (3-keto acid CoA transferase) และอะซิโตอะซิเตทจะเปลี่ยนไปเป็น ดี-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรทโดยเอนไซม์ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส ในลักษณะที่ค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยา (equilibrium constant) ไปเป็น ดี-3-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอ และอะซิโตอะซิเตท มีความสมดุลย์ ดี-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรท ที่ได้จะถูกนำไปใช้ต่อไป

จากสมมติฐานของความสัมพันธ์ระหว่างวัฏจักรเครปส์กับวิถีการสังเคราะห์ PHB และรูปแบบการเจริญกับการสังเคราะห์ PHB ในสภาวะของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนคือฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร เสริมด้วย NB 8 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 17) ได้ทำการวิเคราะห์รูปแบบการผลิตเอนไซม์ และจากการทดลองจะพบว่า ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลสและอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส จะมีค่าเริ่มต้นสูงและจะลดลงและคงที่ ประมาณชั่วโมงที่ 30 ซึ่งการสังเคราะห์ PHB คงที่ในขณะที่การเจริญมีค่าสูงมากจึงอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์เลือกที่จะเข้าสู่วิถีเมตาบอลิซึมที่ให้ผลต่อการเจริญมากกว่าวิถีการสังเคราะห์ PHB แต่ในขณะเดียวกันเซลล์ก็ยังสังเคราะห์ PHB เล็กน้อย ด้วยอัตราการเกิดปฏิกิริยาเท่าเดิม แต่จะมีค่าสะสมต่ำกว่าสภาวะของการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรเพราะน้ำหนักแห้งของเซลล์สูงมาก

เมื่อพิจารณาเอนไซม์ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส ซึ่งตรวจไม่พบแอคติวิตี ดังนั้นจึงอาจไม่มีการย่อยสลาย PHB เนื่องจากในสภาวะเช่นนี้เซลล์ไม่มีความจำเป็นที่จะต้องใช้ PHB เป็นแหล่งคาร์บอน

จากผลการทดลองข้างต้นจึงทำให้เกิดแนวความคิดต่อไปว่า ในสภาวะของการเจริญของเซลล์ตามปกติ ซึ่งสารอาหารมีความสมดุลย์เซลล์จะยังคงมีกระบวนการสังเคราะห์ PHB เกิดขึ้นได้ตลอดเวลา แต่ด้วยอัตราการสังเคราะห์ต่ำจึงได้มีการติดตามรูปแบบการผลิตเอนไซม์ในสภาวะของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรอุดม (รูปที่ 18) ซึ่งจะพบว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลสและอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส มีค่าเพิ่มขึ้นและคงที่ ตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงและในช่วงท้ายของการเจริญ จะพบว่าแอคติวิตีมีค่าใกล้เคียงกับสภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อ

พิจารณาเอนไซม์ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส จะพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นและคงที่ และในช่วงท้ายของการเจริญจะพบว่า มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงประมาณ 1 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มากกว่าสภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรประมาณ 10 เท่า แต่เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ PHB พบว่าจะมีค่าลดลงตลอดเวลาจนเกือบตรวจไม่พบ PHB เลย แสดงว่าในสภาวะดังกล่าวอัตราการย่อยสลายจะเกิดได้รวดเร็วและสูงกว่าอัตราการสังเคราะห์ จนในที่สุดจึงไม่มีการสะสม PHB ภายในเซลล์ โดยที่ปฏิกิริยาของการย่อยสลายจะเกิดขึ้นโดยดีไฮดรอกซีบิวทิเรทจะเปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิเตทและอะซิโตอะซิติลโคเอ ตามลำดับ อะซิโตอะซิติลโคเอที่ได้จะถูกนำไปใช้ในวัฏจักรเครปส์ต่อไป

เมื่อพิจารณาวิถีในทางตรงกันข้าม ซึ่งจะมีการสังเคราะห์ดี-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรท จะพบว่าจะมีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อยเนื่องจากปริมาณ PHB ที่สะสมลดปริมาณลงอย่างเห็นได้ชัดเพราะถ้าปฏิกิริยาเกิดในลักษณะที่เป็นสมดุลย์ ปริมาณ PHB น่าจะคงที่

ดังนั้น จึงอาจเป็นไปได้ว่าในสภาวะที่ส่งเสริมต่อการเจริญ เซลล์จะยังคงมีการสังเคราะห์ PHB ได้ตามปกติแต่ด้วยอัตราการสังเคราะห์ต่ำ แล้วจะมีการสะสมหรือย่อยสลายเพื่อนำ PHB ไปใช้ก็ขึ้นกับความสมบูรณ์ของแหล่งต้นตอคาร์บอนและไนโตรเจนตลอดจนความสามารถในการใช้แหล่งต้นตอนั้น ๆ

จากการทดลองเพาะเลี้ยง *A.eutrophus* ATCC 17697 ในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร และใช้กรดคาร์บอกซิลิค ได้แก่กรดโปรปิโอนิค, กรดบิวทิริค และกรดวาเลอริค เป็นแหล่งคาร์บอนแทนฟรุกโตส (ตารางที่ 5) พบว่า *A.eutrophus* ไม่สามารถเจริญหรือสังเคราะห์ PHB โดยใช้กรดคาร์บอกซิลิคชนิดต่าง ๆ ที่กำหนดให้เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยวได้แม้จะเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานถึง 190 ชั่วโมง ซึ่งแตกต่างกับการเพาะเลี้ยงเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า จุลินทรีย์ไม่มีระบบของการนำกรดคาร์บอกซิลิค ดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ หรือขาดเอนไซม์ในการเปลี่ยนกรดคาร์บอกซิลิคให้อยู่ในรูปที่เหมาะสมกับการนำไปใช้เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเดี่ยวได้

เพื่อให้เซลล์สามารถเจริญในกรดคาร์บอกซิลิคได้ จึงทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรและเสริมด้วยกรดคาร์บอกซิลิค 1 กรัมต่อลิตร และวิเคราะห์เปรียบเทียบลักษณะ และรูปแบบของการสังเคราะห์ PHB และ PHV โดยการไฮโดรไลซ์ให้ได้ผลสุดท้ายเป็น 3HB และ 3HV โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟี จากผลการทดลอง (ตารางที่ 6) จะพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่เสริมด้วยกรดบิวทิริค จะได้ PHB สูงถึง 31.63 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง เพิ่มขึ้นประมาณ 5 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่ไม่ได้เสริมด้วยกรดบิวทิริคในขณะที่ปริมาณ

PHV ที่ผลิตได้จะมีค่าใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงที่ไม่ได้เสริมด้วยกรดบิวทิริค ผลการทดลองจึงแสดงว่า กรดบิวทิริคสามารถถูกนำเข้าสู่เซลล์ได้และนำไปใช้ในการสังเคราะห์ PHB เพียงอย่างเดียวไม่มีการใช้กรดบิวทิริคในวิถีอื่น ๆ โดยที่วิธีของการสังเคราะห์น่าจะเกิดขึ้นได้โดยตรงและง่ายกว่าการสังเคราะห์ PHB จากฟรุกโตสเสียด้วย จึงทำให้ PHB สูงขึ้น โดย PHV ไม่เปลี่ยนแปลง

Doi, Tamaki และคณะ (1988) ได้ศึกษาวิธีการสังเคราะห์ PHB ใน *A.eutrophus* NCIB 1159 เมื่อใช้บิวทิเรทและอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว โดยวิถีทาง Nuclear Magnetic Resonace (NMR) และพบว่าการสังเคราะห์ PHB ในสภาวะดังกล่าวเกิดขึ้นได้ 2 ทางคือ วิถีการสังเคราะห์ที่เสนอขึ้นโดย Senior และ Dawes (1973);Oeding และ Schlegel (1973) (วิถีที่ I) ส่วนอีกวิถีหนึ่ง (วิถีที่ II) เชื่อว่า บิวทิเรทจะถูกเปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอและดี-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอได้โดยตรง ซึ่งไม่ต้องการเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลสในขบวนการสังเคราะห์แต่เมื่อเสริมด้วยกรดโปรปิโอนิคและกรดวาเลอริค จะเห็นได้ว่าเซลล์สามารถเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์ PHV โดยที่กรดวาเลอริคจะให้ PHV มากกว่ากรดโปรปิโอนิค แต่ไปลดปริมาณ PHB ลงบ้าง

Doi, Nakamura และคณะ (1987) รายงานว่า *A.eutrophus* H16 สามารถสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ เมื่อใช้โปรปิโอเนทเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยวโดยที่โปรปิโอเนท จะเปลี่ยนไปเป็นโปรปิโอนิลโคเอแล้วปลดปล่อย ^{13}C-labeled carbonyl ได้เป็นอะซิติลโคเอ ซึ่งจะนำไปสังเคราะห์ดี-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอตามวิถีที่ I ในขณะเดียวกันโปรปิโอนิลโคเอก็จะรวมกับอะซิติลโคเอนไซม์เอเพื่อสังเคราะห์ไฮดรอกซีวาเลอริลโคเอ และได้เป็นดี-ไฮดรอกซีวาเลอเรทตามลำดับ ทำให้ได้โคพอลิเมอร์ที่มีการเรียงตัวของ 3HB และ 3HV อย่างอิสระไม่แน่นอน (random) ภายในการทำงานของเอนไซม์ซินทิเตส (พอลิเมอร์เรส) ส่วนการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ จากกรดเพนทาโนอิค (pentanoic acid) จะเกิดขึ้นโดยการทำงานของวิถีที่ II โดยที่กรดเพนทาโนอิคจะถูกเมตาบอไลซ์ โดยไม่ทำลายพันธะคาร์บอนได้เป็นดี-ไฮดรอกซีวาเลอริลโคเอและเปลี่ยนเป็น 3HV

ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าการสังเคราะห์ PHV ที่เพิ่มขึ้นอาจเกิดขึ้นตามสมมติฐานดังกล่าว แต่ปริมาณ PHB ที่ลดลง อาจเนื่องมาจากโปรปิโอนิลโคเอ จะดึงเอาอะซิติลโคเอที่จะเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ PHB ไปใช้ แล้วนำไปสร้าง PHV แทน

และเมื่อทำการหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างการวิเคราะห์ด้วยวิธี spectrophotometry กับแก๊สโครมาโตกราฟฟี เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพจะพบว่าค่าความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟีกับ spectrophotometry มีค่าประมาณ

1.92±0.065 เมื่อใช้จำนวนตัวอย่างเท่ากับ 9 นั่นคือ ปริมาณ PHB จะมีค่าสูงเกือบ 2 เท่าของวิธีวิเคราะห์ด้วย spectrophotometry เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟีภายใต้สภาวะของการเพาะเลี้ยงเดียวกัน ทั้งนี้ก็เนื่องมาจากวิธี spectrophotometry มีหลายขั้นตอนในการสกัดแยก จึงมีโอกาสสูญเสียได้ง่ายกว่า นอกจากนี้ยังขึ้นกับ sensitivity ของวิธีการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟี ซึ่งจะมีค่าสูงกว่าอีกด้วย

และจากการติดตามรูปแบบการผลิตเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดที่ได้ศึกษามาแต่ต้น โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะเดียวกับที่ใช้ข้างต้น เมื่อเลือกกรดบิวทิริคเป็นตัวแทนในการศึกษา (รูปที่ 19) พบว่าการผลิตเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลสและอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส จะลดลงตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงและคงที่ เมื่อปริมาณ PHB คงที่ และเมื่อเทียบค่าแอคติวิตีจำเพาะกับสภาวะของการเพาะเลี้ยงปกติในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ไม่เสริมด้วยกรดบิวทิริค จะพบว่าในช่วงต้นของการเจริญ (ที่เวลา 20-30 ชั่วโมง) เมื่อปริมาณ PHB ในอาหารที่เสริมด้วย กรดบิวทิริคสูงขึ้นเกือบ 2 เท่า จะพบค่าแอคติวิตีจำเพาะของเบต้า-คีโตไธโอเลสและอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตสเพิ่มขึ้น 9-10 เท่า และ 3-4 เท่าตามลำดับ ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าในช่วงเวลาดังกล่าวเซลล์จะนำกรดบิวทิริคไปใช้สังเคราะห์ PHB โดยเปลี่ยนเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอ แล้วเข้าสู่วิถีของการสังเคราะห์ PHB ได้โดยตรง (วิถีที่ II) แต่เมื่อพิจารณาค่าแอคติวิตีของเบต้า-คีโตไธโอเลส ซึ่งมีค่าสูงกว่าสภาวะปกติ ในขณะที่วิถีที่ II ของการสังเคราะห์ PHB ไม่จำเป็นต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส ทำให้เกิดแนวความคิดว่าอะซิโตอะซิติลโคเอที่ได้จากกรดบิวทิริคอาจจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิติลโคเอ โดยอะซิติลโคเอที่ได้บางส่วนจะเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ PHB ที่ I และบางส่วนอาจจะเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ด้วย และเมื่อพิจารณารูปแบบของการสังเคราะห์เอนไซม์ทั้งสองชนิด จะพบว่ามีค่าลดลงและคงที่ ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณ PHB คงที่ด้วย ในขณะที่ความขุ่นมีค่าเพิ่มขึ้น แสดงว่าเซลล์เข้าสู่วิถีของการเจริญมากกว่าวิถีการสังเคราะห์ PHB

ส่วนรูปแบบของการสังเคราะห์เอนไซม์ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส จะพบว่ามีค่าลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 40 และในชั่วโมงที่ 70 แทบจะไม่พบแอคติวิตีเลย ซึ่งสอดคล้องกับผลของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมและแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร เสริมด้วย NB 8 กรัมต่อลิตร ที่เซลล์ไม่มีความจำเป็นต้องใช้ PHB

จากการศึกษาทั้งหมดข้างต้น ทำให้ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมและส่งเสริมให้มีการสังเคราะห์ PHB ตลอดจนความสัมพันธ์ของเอนไซม์กับวิถีการสังเคราะห์และย่อยสลาย PHB ซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงหรือหาแนวทางในการเพิ่มผลผลิตต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. รูปแบบการสังเคราะห์ PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ในสภาพการเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร จะเกิดควบคู่กับการเจริญและสามารถสังเคราะห์ PHB ได้สูงสุดหลังจากที่การสังเคราะห์โปรตีนสิ้นสุดลง โดยจะได้ปริมาณ PHB สูงสุดประมาณ 13 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งที่เวลา 70-100 ชั่วโมง

2. การเตรียมเชื้อตั้งต้นในอาหารสูตรอุดมแล้วจึงนำไปเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่เพื่อผลิต PHB พบว่าการเจริญและการสังเคราะห์ PHB เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกับข้างต้น สามารถผลิต PHB ได้สูงขึ้นกว่าเดิมอย่างชัดเจนคือ ประมาณ 16 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งที่เวลา 40 ชั่วโมง

3. สภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณ PHB สูงกว่าฟรุกโตส 40 กรัมต่อลิตรเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรเพียงเล็กน้อย แต่ระยะเวลาของการผลิตจะสั้นกว่าประมาณ 2 เท่า

4. *A.eutrophus* ATCC 17697 สามารถเจริญและสังเคราะห์ PHB ได้ เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนโดยสามารถสังเคราะห์ PHB ได้ประมาณ 16.5 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งที่เวลา 110-120 ชั่วโมง หลังจากนั้นปริมาณ PHB จะลดลงในขณะที่เซลล์มีการเจริญและสังเคราะห์โปรตีนเพิ่มขึ้น

5. สภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 และ 0.5 กรัมต่อลิตร (ฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร) จะส่งเสริมให้มีการสังเคราะห์ PHB ได้สูงสุดประมาณ 30 และ 35 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ

6. ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรฟลาสก์ 20 เปอร์เซนต์ เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่าที่จะส่งเสริมให้มีการสังเคราะห์ PHB ได้สูง

7. เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *A.eutrophus* ในอาหารสูตรอุดม จะพบความสัมพันธ์ในลักษณะผกผันระหว่างการผลิต PHB กับการสังเคราะห์โปรตีน

8. เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรและเสริมด้วยอาหารสูตรอุดม (NB) 8 กรัมต่อลิตร จะพบการเจริญแบ่งเป็น 2 ช่วงโดยในช่วงแรกเซลล์จะมีการใช้อาหารสูตรอุดมและแอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อการเจริญและสังเคราะห์ PHB และในช่วงที่สองซึ่งเซลล์มีการใช้ฟรุกโตสร่วมกับ

แอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้เซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในขณะที่ปริมาณ PHB คงที่ (ประมาณ 6-7 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง)

9. การผลิตเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลสและอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตสจะสูงขึ้นตามปริมาณการเพิ่มการสังเคราะห์ PHB ในช่วงของการเจริญทวีคูณ และจะลดลงและคงที่ในระยะการเจริญสูงสุดซึ่งปริมาณ PHB คงที่ สำหรับสภาวะของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 และ 2 กรัมต่อลิตร แต่จะมีค่าลดลงและคงที่เมื่อเซลล์มีการเจริญสูง สำหรับสภาวะของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรเสริมด้วยอาหารสูตรอุดมและกรดบิวทิริค ส่วนการผลิตเอนไซม์ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนสจะสูงในสภาวะที่มีการจำกัดการเจริญ และจะพบแอคติวิตีน้อยมากหรือไม่พบเลยในสภาวะที่เซลล์สามารถเจริญได้หรือเจริญได้ดี

10. ในสภาวะของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรอุดม การผลิตเอนไซม์ทั้งสามชนิดจะมีค่าเพิ่มขึ้นและคงที่ และจะไม่พบการสะสมของ PHB ในช่วงท้ายของการเจริญ (ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12) เนื่องจากอัตราการย่อยสลายจะเกิดขึ้นได้รวดเร็วและสูงกว่าอัตราการสังเคราะห์

11. *A.eutrophus* จะใช้กรดบิวทิริคเพื่อการสังเคราะห์ PHB และใช้กรดโปรปิโอนิคและกรดวาเลอริคเพื่อการสังเคราะห์ PHV

12. ค่าความสัมพันธ์ (correlation factor) ระหว่างการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟีกับสเปคโตรโฟโตเมตตรีมีค่าประมาณ 1.92 ± 0.065 เมื่อจำนวนตัวอย่างเท่ากับ 9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย