

การตรวจติดตามเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์และการสังเคราะห์
พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) ใน *Bacillus megaterium* BA-019



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MONITORING OF KEY ENZYMES INVOLVED IN CELL GROWTH AND
POLY(3-HYDROXYBUTHYRATE) SYNTHESIS IN *Bacillus megaterium* BA-019

Mr. Natharong Sirikong



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจติดตามเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์และการสังเคราะห์ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) ใน <i>Bacillus megaterium</i> BA-019
โดย	นายณธรง ศิริคง
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร.สงศรี กุลปรีชา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐฐา ทองจุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรัทธา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร.สงศรี กุลปรีชา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐฐา ทองจุล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร กิจปรีชาวนิช)

ณตรง ศิริคง : การตรวจติดตามเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์และการสังเคราะห์ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) ใน *Bacillus megaterium* BA-019 (MONITORING OF KEY ENZYMES INVOLVED IN CELL GROWTH AND POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) SYNTHESIS IN *Bacillus megaterium* BA-019) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. ดร.สงศรี กุลปรีชา, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.ณัฐภา ทองจุล, 130 หน้า.

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาภาวะที่เหมาะสมบางประการ ได้แก่ ปริมาณออกซิเจนละลาย (dissolved oxygen) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเติมกรดซิตริกความเข้มข้นที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ *Bacillus megaterium* BA-019 มีการเจริญและการสังเคราะห์พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ P(3HB) เพิ่มมากขึ้น โดยการตรวจวัดแอกติวิตีของปีต้า-คีโตไทโอเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีการสังเคราะห์ P(3HB) และตรวจวัดแอกติวิตีของซีเตรท ซินเทส ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีกรดไตรคาร์บอกซิลิก ในภาวะที่แปรปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20 40 60 และ 80% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน พบว่าแอกติวิตีของซีเตรท ซินเทสเพิ่มขึ้นระหว่างชั่วโมงที่ 12 ถึง 18 ของกระบวนการเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ภาวะ ซึ่งภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของ *B. megaterium* BA-019 และการสังเคราะห์ P(3HB) คือ ภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนเท่ากับ 60% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน โดยมีแอกติวิตีมากที่สุดที่ 12 ชั่วโมงคือ 0.6007 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุดคือ 24.39 กรัมต่อลิตร ส่วนแอกติวิตีของปีต้า-คีโตไทโอเลสเพิ่มสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 3 ของกระบวนการเลี้ยงเชื้อในทุกภาวะ แต่เมื่อมีปริมาณออกซิเจนเท่ากับ 60% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจนทำให้มีแอกติวิตีของปีต้า-คีโตไทโอเลสสูงที่สุดเท่ากับ 0.0408 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และได้ความเข้มข้นของ P(3HB) สูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 18 คือ 6.98 กรัมต่อลิตร ส่วนการศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดซิตริก (1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร) พบว่าเมื่อเติมกรดซิตริกที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร พบว่าแอกติวิตีของซีเตรท ซินเทสมีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 2.3239 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และได้น้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 12 เท่ากับ 29.93 กรัมต่อลิตร และยังมีผลทำให้แอกติวิตีของปีต้า-คีโตไทโอเลสสูงที่สุด ได้แก่ 1.1584 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนที่ชั่วโมงที่ 3 และได้ความเข้มข้นของ P(3HB) สูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 12 เท่ากับ 8.71 กรัมต่อลิตร

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา	2557	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5572202123 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) / CITRATE SYNTHASE / β -KETOTHIOLASE

NATHARONG SIRIKONG: MONITORING OF KEY ENZYMES INVOLVED IN CELL GROWTH AND POLY(3-HYDROXYBUTHYRATE) SYNTHESIS IN *Bacillus megaterium* BA-019. ADVISOR: PROF. SONGSRI KULPREECHA, D.Eng., CO-ADVISOR: ASST. PROF. NUTTHA THONGCHUL, Ph.D., 130 pp.

Citrate synthase and β -ketothiolase activities responsible in cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) or P(3HB) synthesis of *B. megaterium* strain BA-019 were studied under various dissolved oxygen (DO) concentration conditions (20%, 40%, 60% and 80% saturation). Under the DO levels studied, the activity of citrate synthase was increased between 12 and 18 h during fermentation cultivation. The maximum activity of 0.6007 unit per mg protein was obtained at 12 h when the DO level was maintained at 60%. This resulted in the maximum cell biomass production (24.39 g/L) later at 15 h. On the other hand, the maximum activity of b-ketothiolase was observed at 3 h cultivation in all DO levels studied. Among 4 DO levels studied, the DO level of 60% also provided the highest b-ketothiolase activity (0.0408 unit per mg protein). This eventually led to the maximum P(3HB) concentration of 6.98 g/L achieved at 18 h cultivation. From the knowledge of enzyme expression, cell growth, and product formation kinetics, later in this study, citric acid was used to regulate the metabolic flux toward P(3HB) production. Citric acid at different concentrations (1-5 g/L) was initially added into the fermentation medium. It was found that the activity of citrate synthase was dramatically increased to 2.3239 unit per mg protein (almost 6 times higher) with the corresponding maximum biomass of 29.93 g/L at 12 h cultivation when 2 g/L citric acid was added into the medium. The maximum activity of b-ketothiolase was also increased to 1.1584 unit per mg protein at 3 h (almost 3 times higher) when the improved P(3HB) production of 8.71 g/L within 12 h cultivation.

Department: Microbiology

Student's Signature

Field of Study: Industrial Microbiology

Advisor's Signature

Academic Year: 2014

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ศาสตราจารย์ ดร. สงศรี กุลปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณีฎฐา ทองจุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และ ข้อคิดเห็นต่างๆแก่ข้าพเจ้า รวมทั้งช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ตลอดจนความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำงานวิจัยได้สำเร็จ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาติธิ-สิริศรัทธา ที่กรุณารับเป็นประธาน กรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน และรองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชสวานิช ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อาจารย์วาสนา โตเลี้ยง และเจ้าหน้าที่ในสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและ วิศวกรรมพันธุศาสตร์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัครลาภสกุล ที่กรุณาให้คำปรึกษาและ ความช่วยเหลือเพื่อการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเชิงกลด้วยเครื่องอัลตราโซนิค

ขอขอบพระคุณ บริษัท มิตรผลวิจัยและพัฒนา ที่ให้ความอนุเคราะห์กากน้ำตาลเพื่อใช้ ในงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ พี่ๆ และเพื่อนๆในห้องวิจัย 1804/13 ทุกท่าน รวมถึงพี่ๆ เพื่อนๆและน้องๆ ระดับปริญญาโทและปริญญาเอก ภาควิชาจุลชีววิทยา สำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจตลอด มา

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน สำหรับความช่วยเหลือและการ อำนวยความสะดวกในด้านต่างๆภายในภาควิชา

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวของข้าพเจ้า สำหรับ ความรัก ความห่วงใย คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูป.....	ฅ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
มูลเหตุจูงใจในงานวิจัย	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2	5
บริษัทนวัตกรรมกรรม.....	5
2.1 พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastics)	5
2.2 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	6
2.2.1 โครงสร้างทางเคมีของ PHAs.....	7
2.2.2 การจัดจำแนกชนิดของ PHAs	8
2.3.1 โครงสร้างของ P(3HB)	11
2.3.2 สมบัติทางกายภาพและความร้อนของ P(3HB).....	12
2.3.3 จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้.....	15
2.3.4 การสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดย <i>Bacillus</i> spp.	17

2.3.6	วิธีชีวสังเคราะห์ของ P(3HB).....	21
2.3.7	การควบคุมวิธีชีวสังเคราะห์ P(3HB)	23
2.3.8	การนำ P(3HB) ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์.....	26
2.4	เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในงานวิจัย.....	27
2.4.1	ซิเตรท ซินเทส (citrate synthase).....	27
2.4.2	การวิเคราะห์ซิเตรท ซินเทส โดยใช้ Ellman's reagent.....	29
2.4.3	บีต้า-คีโตนไธโอเลส (beta -ketothiolase)	30
2.4.4	การวิเคราะห์บีต้า-คีโตนไธโอเลส โดยใช้ Cleland's reagent.....	32
บทที่ 3	33
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....		33
3.1	วัสดุอุปกรณ์.....	33
3.2	เคมีภัณฑ์.....	34
3.3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	37
3.3.1	จุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษา.....	37
3.3.2	อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	38
3.3.3	การเก็บรักษาจุลินทรีย์.....	40
3.3.4	การเลี้ยงเชื้อ <i>B. megaterium</i> BA-019 เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ เหมาะสมต่อการเจริญและการสังเคราะห์ P(3HB).....	40
3.3.5	การเลี้ยงเชื้อ <i>B. megaterium</i> BA-019 เพื่อศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนละลาย ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการเจริญและการสังเคราะห์ P(3HB) โดยการตรวจ ติดตามแอกติวิตีของซิเตรท ซินเทส และบีต้า-คีโตนไธโอเลส.....	41
3.3.6	การเลี้ยงเชื้อ <i>B. megaterium</i> BA-019 เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดซิ ตริกที่มีต่อการเจริญ และการสังเคราะห์ P(3HB) โดยการตรวจติดตามแอกติวิตี ของซิเตรท ซินเทส และบีต้า-คีโตนไธโอเลส.....	42

3.4 วิธีวิเคราะห์	42
3.4.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง	42
3.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด	43
3.4.3 การวิเคราะห์สัดส่วนของมอนอเมอร์และปริมาณของพอลิเมอร์โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography; GC).....	43
3.4.4 การตรวจติดตามซิเตรท ซินเทส และปีต้า-คีโตไทโอเลส	44
3.4.4.2 การวิเคราะห์แอกติวิตีของปีต้า-คีโตไทโอเลส.....	44
3.4.4.2 การวิเคราะห์แอกติวิตีของซิเตรท ซินเทส.....	44
บทที่ 4	46
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	46
4.1 การเลี้ยงเชื้อ <i>B. megaterium</i> BA-019 เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสังเคราะห์ P(3HB).....	46
4.2 การเลี้ยงเชื้อ <i>B. megaterium</i> BA-019 เพื่อศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการเจริญและการผลิต P(3HB) โดยการตรวจติดตามแอกติวิตีของซิเตรท ซินเทส และปีต้า-คีโตไทโอเลส	54
4.3 การเลี้ยงเชื้อ <i>B. megaterium</i> BA-019 เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดซิตริกที่มีต่อการเจริญ และการผลิต P(3HB) โดยการตรวจติดตามแอกติวิตีของซิเตรท ซินเทส และปีต้า-คีโตไทโอเลส.....	78
4.4 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอกติวิตีของซิเตรท ซินเทส และปีต้าคีโตไทโอเลส เมื่อเลี้ยงเชื้อ <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 60% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน และเติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อและไม่ได้เติมกรดซิตริก	108
บทที่ 5	111
สรุปผลการทดลอง.....	111

รายการอ้างอิง	114
ภาคผนวก ก.....	124
การเตรียมวัตถุดิบและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	124
1. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำตาล	124
2. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ P(3HB).....	124
3. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เอนไซม์.....	124
ภาคผนวก ข.....	126
สูตรคำนวณ.....	126
1. การคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์	126
2. การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง.....	127
3. การคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่าง.....	127
4. การคำนวณปริมาณ P(3HB) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี.....	127
5. การคำนวณแอกติวิตีของเอนไซม์.....	127
ภาคผนวก ค.....	128
กราฟมาตรฐาน	128
1. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรวม.....	128
2. กราฟมาตรฐาน P(3HB) วิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี.....	128
ภาคผนวก ค.....	129
โครมาโทแกรม	129
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	130

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	การจำแนกประเภทของ PHAs ตามเกณฑ์ต่างๆ.....	8
ตารางที่ 2	สมบัติการละลายของ P(3HB).....	12
ตารางที่ 3	สมบัติทางกายภาพและความร้อนของ P(3HB) เปรียบเทียบกับพอลิพรอพิลีน	14
ตารางที่ 4	จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB).....	15
ตารางที่ 5	<i>Bacillus</i> spp. ที่สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้	18
ตารางที่ 6	แสดงโปรตีนควบคุม (regulatory protein) ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ P(3HB).....	25
ตารางที่ 7	ข้อมูลทางจลนศาสตร์ของซิเตรท ซินเทส ในแบคทีเรียชนิดต่างๆ	29
ตารางที่ 8	แสดงข้อมูลทางจลนศาสตร์ของปีต้า-คีโตไทโอเลส.....	31
ตารางที่ 9	น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลทรายที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร	48
ตารางที่ 10	น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร	50
ตารางที่ 11	เปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) ปริมาณ P(3HB) อัตราผลผลิต P(3HB) และค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ที่สำคัญ เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลทรายและในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากน้ำตาลซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร	52
ตารางที่ 12	องค์ประกอบของกากน้ำตาล.....	53
ตารางที่ 13	น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 20% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน.....	56
ตารางที่ 14	น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของปีต้า-คีโตไทโอเลส แอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 20% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน	58

ตารางที่ 15 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยง เชื้อ 40% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน..... 60

ตารางที่ 16 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส แอคติ วิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายใน อาหารเลี้ยงเชื้อ 40% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน 62

ตารางที่ 17 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยง เชื้อ 60% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน..... 64

ตารางที่ 18 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส แอคติ วิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหาร เลี้ยงเชื้อ 60% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน 66

ตารางที่ 19 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยง เชื้อ 80% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน..... 68

ตารางที่ 20 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแ อคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายใน อาหารเลี้ยงเชื้อ 80% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน 70

ตารางที่ 21 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของ P(3HB) สูงที่สุด เมื่อแปร ปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20 40 60 และ 80% ของค่าความอิ่มตัว ของออกซิเจน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 72

ตารางที่ 22 เปรียบเทียบแอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส เมื่อแปรปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20 40 60 และ 80% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 73

ตารางที่ 23 เปรียบเทียบแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อแปรปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ใน อาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20 40 60 และ 80% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 75

ตารางที่ 24 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกรดซิตริก.....	80
ตารางที่ 25 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอ คติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกรดซิ ตริก.....	82
ตารางที่ 26 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความ เข้มข้น เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร.....	84
ตารางที่ 27 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอ คติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริก ความเข้มข้นเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร.....	86
ตารางที่ 28 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความ เข้มข้นเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร.....	88
ตารางที่ 29 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอ คติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริก ความเข้มข้นเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร.....	90
ตารางที่ 30 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความ เข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร.....	92
ตารางที่ 31 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอ คติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริก ความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร.....	94
ตารางที่ 32 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความ เข้มข้นเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร.....	96

- ตารางที่ 33** น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริก ความเข้มข้นเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร..... 98
- ตารางที่ 34** น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร 100
- ตารางที่ 35** น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริก ความเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร..... 102
- ตารางที่ 36** เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร และไม่เติมกรดซิตริก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 104
- ตารางที่ 37** เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 60% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน และเติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อและไม่ได้เติมกรดซิตริก..... 109
- ตารางที่ 38** เปรียบเทียบแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส และบีต้า-คีโตไทโอเลส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 60% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน และเติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อและไม่ได้เติมกรดซิตริก..... 110

สารบัญรูป

รูปที่ 1	การแบ่งประเภทของพลาสติก	6
รูปที่ 2	โครงสร้างทางเคมีของ PHAs.....	7
รูปที่ 3	ลักษณะของ P(3HB) แกรนูลของ <i>C. necator</i> สายพันธุ์ A-04 เซลล์ที่ย้อมด้วยสีซูดาน แบล็ก บี และเซลล์ที่ย้อมด้วยสีไนล์ บูล เอ.....	11
รูปที่ 4	ภาพวาดโครงสร้างผลึกของ P(3HB) (Reusch, 2013).....	12
รูปที่ 5	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ 3-hydroxybutyrate และ P(3HB).....	12
รูปที่ 6	วิธีชีวสังเคราะห์ P(3HB)	22
รูปที่ 7	วิธีชีวสังเคราะห์ P(3HB) ของ <i>R. eutropha</i> และการควบคุมวิธีชีวสังเคราะห์.....	24
รูปที่ 8	แสดงโครงสร้างของซิเตรท ซินเทส ในยูคาริโอต และ แบคทีเรีย	28
รูปที่ 9	โครงสร้างทางเคมีของ DTNB.....	30
รูปที่ 10	ปฏิกิริยาของ DTNB กับหมู่ไรโอดอล	30
รูปที่ 11	แสดงโครงสร้างแบบเตตระเมอริกของปีต้า-คีโตไทโอเลส จาก <i>Zoogloea ramigera</i>	31
รูปที่ 12	โครงสร้างทางเคมีของ DTT	32
รูปที่ 13	ปฏิกิริยารีดักชันของพันธะไดซัลไฟด์ โดย DTT เกิดเป็น ไทออล-ไดซัลไฟด์.....	32
รูปที่ 14	<i>B. megaterium</i> BA-019 เมื่อย้อมสีแกรม.....	37
รูปที่ 15	<i>B. megaterium</i> สายพันธุ์ BA-019 เมื่อย้อมสีซูดาน แบลค บี.....	37
รูปที่ 16	น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลทรายที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร	49
รูปที่ 17	น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร	51

รูปที่ 18 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยง เชื้อ 20% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน..... 57

รูปที่ 19 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอคติ วิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายใน อาหารเลี้ยงเชื้อ 20% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน 59

รูปที่ 20 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยง เชื้อ 40% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน..... 61

รูปที่ 21 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอคติ วิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายใน อาหารเลี้ยงเชื้อ 40% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน 63

รูปที่ 22 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยง เชื้อ 60% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน..... 65

รูปที่ 23 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอคติ วิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายใน อาหารเลี้ยงเชื้อ 60% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน 67

รูปที่ 24 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยง เชื้อ 80% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน..... 69

รูปที่ 25 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอคติ วิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายใน อาหารเลี้ยงเชื้อ 80% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน 71

รูปที่ 26 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของ P(3HB) สูงที่สุด เมื่อแปรปริมาณ ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20 40 60 และ 80% ของค่าความอิ่มตัวของ ออกซิเจน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 72

รูปที่ 27 เปรียบเทียบแอกติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส เมื่อแปรปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20 40 60 และ 80% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน เมื่อเลี้ยงเชื้อ <i>B. megaterium</i> BA-019 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	74
รูปที่ 28 เปรียบเทียบแอกติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อแปรปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20 40 60 และ 80% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน เมื่อเลี้ยงเชื้อ <i>B. megaterium</i> BA-019 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	76
รูปที่ 29 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกรดซิตริก	81
รูปที่ 30 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอกติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอกติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกรดซิตริก ...	83
รูปที่ 31 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้น เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร.....	85
รูปที่ 32 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอกติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอกติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร.....	87
รูปที่ 33 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร	89
รูปที่ 34 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอกติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอกติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร.....	91
รูปที่ 35 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร	93
รูปที่ 36 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอกติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอกติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร.....	95

รูปที่ 37 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร 97

รูปที่ 38 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของปีต้า-คีโตไทโอเลส และแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร..... 99

รูปที่ 39 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร 101

รูปที่ 40 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของปีต้า-คีโตไทโอเลส และแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร..... 103

รูปที่ 41 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร และไม่เติมกรดซิตริก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 104

รูปที่ 42 เปรียบเทียบแอคติวิตีของปีต้า-คีโตไทโอเลส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร และไม่เติมกรดซิตริก..... 105

รูปที่ 43 เปรียบเทียบแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร และไม่เติมกรดซิตริก 105

รูปที่ 44 วิธี TCA และวิธีชีวสังเคราะห์ P(3HB) เมื่อมีการเติมกรดซิตริกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 107

บทที่ 1

บทนำ

การเพิ่มของประชากรโลกนำไปสู่การสะสมของขยะที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ในปริมาณเพิ่มมากขึ้น ซึ่งขยะจากพลาสติกที่สังเคราะห์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีมีปริมาณมากเป็นอันดับหนึ่งของขยะที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ในสิ่งแวดล้อม (Luengo และคณะ, 2003) เนื่องจากถูกนำมาใช้เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์บรรจุภัณฑ์ของและอื่นๆ เพราะพลาสติกมีสมบัติที่ดีหลายประการเมื่อเทียบกับวัสดุอื่น คือ มีน้ำหนักเบา มีความแข็งแรงทนทาน สามารถทนต่อสารเคมีและความร้อน กันน้ำได้ดี และสามารถปรับแต่งให้มีลักษณะตามต้องการได้ รวมทั้งมีการผลิตที่ใช้ต้นทุนต่ำ ทำให้มีราคาถูก (Loo และ Sudesh, 2007) พลาสติกที่สังเคราะห์จากปิโตรเคมีส่วนใหญ่ ได้แก่ พอลิพรอพิลีน (polypropylene) หรือ PP พอลิเอทิลีน (polyethylene) หรือ PE และพอลิไวนิลคลอไรด์ (polyvinylchloride) หรือ PVC อย่างไรก็ตามพลาสติกสังเคราะห์เหล่านี้เป็นวัสดุที่ไม่สามารถย่อยสลายได้หรือใช้เวลานานในการย่อยสลาย จึงเป็นสาเหตุให้เกิดมลภาวะในสิ่งแวดล้อม โดยทั่วไปพลาสติกสังเคราะห์เหล่านี้ไม่นิยมนำกลับมาแปรรูปเพื่อใช้งานใหม่ เนื่องจากพลาสติกมีการปนเปื้อนจากการใช้งานค่อนข้างมาก จำเป็นต้องผ่านกระบวนการแยกชนิดและต้องผ่านการทำความสะอาด รวมถึงสมบัติของพลาสติกจะไม่เหมือนกับการผลิตครั้งแรก ดังนั้นเพื่อลดปัญหาของมลภาวะด้านพลาสติกสังเคราะห์เหล่านี้ จึงมีในการศึกษาวิจัยเพื่อผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้โดยวิธีทางธรรมชาติ เช่น พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates) หรือ PHAs พอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid) หรือ PLA รวมถึงโคพอลิเมอร์และอนุพันธ์ผสมของพอลิเมอร์เหล่านี้ (Kulpeecha, 2006) เพื่อใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีที่ไม่สามารถย่อยสลายได้

พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) (poly(3-hydroxybutyric acid)) หรือ P(3HB) เป็นพอลิเอสเทอร์สายตรงของกรดไฮดรอกซีบิวทิริก ซึ่งอยู่ในกลุ่มของพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates) หรือ PHAs P(3HB) จะถูกสังเคราะห์และสะสมอยู่ในเซลล์จุลินทรีย์ เช่น *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium glutamicum* เป็นต้น (Jo และคณะ, 2006) เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำรองเก็บไว้ในเซลล์ การกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์

P(3HB) ทำได้โดยการเลี้ยงจุลินทรีย์ให้อยู่ในภาวะการเจริญที่ไม่สมดุล (unbalanced growth condition) คือ ภายใต้อาหารที่ขาดแคลนสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ ออกซิเจน หรือแร่ธาตุอื่นบางชนิด โดยให้มีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไป (Lee, 1996) ซึ่ง P(3HB) ที่จุลินทรีย์สังเคราะห์จะถูกสะสมไว้ในแกรนูลภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์

เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในภาวะที่จุลินทรีย์ได้รับสารอาหารเพียงพอ วิถีชีวสังเคราะห์ (biosynthesis pathway) ของจุลินทรีย์ จะถูกเหนี่ยวนำให้เข้าสู่วิถีกรดไตรคาร์บอกซิลิก (tricarboxylic acid pathway) ด้วยเอนไซม์ซิเตรท ซินเธส (citrate synthase) โดยมีสารมัธยันตร์ (intermediate compound) คือ อะเซทิล-โคเอ (acetyl-CoA) เพื่อการเจริญของเซลล์ และได้คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Aldor และ Keasling, 2003) ในภาวะที่จุลินทรีย์ขาดแคลนสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ หรือออกซิเจน เป็นต้น อะเซทิล-โคเอจะไม่เข้าสู่วิถีกรดไตรคาร์บอกซิลิก แต่ถูกเหนี่ยวนำให้เข้าสู่วิถีสังเคราะห์ P(3HB) และมีการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำรองเก็บไว้ในเซลล์

วิถีการสังเคราะห์ P(3HB) ประกอบด้วยปฏิกิริยาหลายขั้นตอน ซึ่งมีเอนไซม์จำเพาะ 3 ชนิด คือ ปีต้า-คีโตไธโอเลส (β -ketothiolase) อะซิโตอะซีทิล-โคเอ รีดักเทส (acetoacetyl-CoA reductase) และ P(3HB) ซินเธส (P(3HB) synthase) โดยปีต้า-คีโตไธโอเลส จะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนอะซีทิล-โคเอ 2 โมเลกุล เป็นอะซิโตอะซีทิล-โคเอ จากนั้นอะซิโตอะซีทิล-โคเอ รีดักเทส จะเร่งปฏิกิริยาให้เกิดปีต้า-ไฮดรอกซิลบิวทิล-โคเอ (β -hydroxybutyryl-CoA) และปฏิกิริยาสุดท้าย คือ ปฏิกิริยาการเกิดพอลิเมอร์ (polymerization) ให้เป็น P(3HB) โดย P(3HB) ซินเธส (Hao และคณะ, 2012)

การควบคุมวิถีการสังเคราะห์ P(3HB) เพื่อให้มีการสังเคราะห์ P(3HB) เพิ่มมากขึ้น สามารถควบคุมได้ในระดับต่างๆ คือ 1. การกระตุ้นการแสดงออกของยีน *pha* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมเอนไซม์ในวิถีสังเคราะห์ P(3HB) ให้มีการแสดงออกมากขึ้น 2. การกระตุ้นเอนไซม์ในวิถีสังเคราะห์ P(3HB) โดยภาวะจำเพาะต่างๆ หรือสารมัธยันตร์ที่เกี่ยวข้อง 3. การยับยั้งเอนไซม์ในวิถีสังเคราะห์อื่นที่เกี่ยวข้อง เช่น วิถีกรดไตรคาร์บอกซิลิก เป็นต้น และ 4. การใช้วิธีที่กล่าวมาข้างต้นร่วมกัน (Kessler และ Witholt, 2001)

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาภาวะที่เหมาะสมบางประการ ในการควบคุมวิถีชีวสังเคราะห์ใน *B. megaterium* สายพันธุ์ BA-019 เพื่อเพิ่มผลผลิตของ P(3HB) โดยการตรวจวัดแอกติวิตีของเบต้า-คีโตนไฮโอเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีการสังเคราะห์ P(3HB) ตรวจวัดแอกติวิตีของซิเตรท ซินเธส ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีกรดไตรคาร์บอกซิลิก และเปรียบเทียบกับปริมาณ P(3HB) ที่แบคทีเรียผลิต ซึ่งจะนำไปสู่การปรับปรุงกระบวนการผลิตให้ได้ P(3HB) ปริมาณมากขึ้น เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

มูลเหตุจูงใจในงานวิจัย

โดยปกติการผลิต P(3HB) เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ภายใต้ภาวะที่ขาดสมดุลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน กล่าวคือในภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป แต่มีปริมาณไนโตรเจนพอสฟอรัส หรือออกซิเจน จำกัด ทำให้วิถีชีวสังเคราะห์ไม่เข้าสู่วิถีกรดไตรคาร์บอกซิลิก (tricarboxylic acid pathway) แต่จะเข้าสู่วิถีสังเคราะห์ P(3HB) แทน จึงมีการสะสม P(3HB) แต่มีการสร้างเซลล์ในปริมาณน้อย ทำให้ผลผลิตของ P(3HB) มีปริมาณไม่มากเท่าที่ต้องการในการนำมาผลิตเพื่อใช้ประโยชน์เชิงอุตสาหกรรม ดังนั้นหากมีการควบคุมวิถีชีวสังเคราะห์ให้เข้าสู่ทั้ง 2 วิถี คือวิถีกรดไตรคาร์บอกซิลิก และวิถีการสังเคราะห์ P(3HB) จะทำให้มีการสร้างเซลล์ไปพร้อมกับการสังเคราะห์ P(3HB) และทำให้ได้ผลผลิตของ P(3HB) เพิ่มมากขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะศึกษาภาวะที่เหมาะสมบางประการ ซึ่งได้แก่ ปริมาณออกซิเจนละลาย (dissolved oxygen) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเติมกรดซิตริกในปริมาณที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจะช่วยให้วิถีชีวสังเคราะห์เข้าสู่ทั้ง 2 วิถีอย่างสมดุล โดยการตรวจวัดแอกติวิตี (activity) ของบีต้า-คีโตนไฮโอเลส (β -ketothiolase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีการสังเคราะห์ P(3HB) ตรวจวัดแอกติวิตีของซิเตรทซินเธส (citrate synthase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีกรดไตรคาร์บอกซิลิก และเปรียบเทียบกับปริมาณ P(3HB) ที่แบคทีเรียผลิต ทั้งนี้เพื่อนำไปสู่การปรับปรุงกระบวนการผลิตให้มีผลผลิตสูง ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตลดลง และทำให้มีการผลิตในราคาที่แข่งขันได้และนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการควบคุมวิถีชีวสังเคราะห์ใน *B. megaterium* BA-019 โดยการตรวจติดตามเอนไซม์ที่สำคัญเกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์และการสังเคราะห์พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) เพื่อเพิ่มผลผลิตของพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อแอกติวิตีของซีเตรทซินเนส และปีต้า-คีโตไทโอเลส ซึ่งส่งผลต่อการเจริญ และการผลิต P(3HB) ของ *B. megaterium* BA-019

2. ศึกษาผลของความเข้มข้นของซีเตรทที่มีต่อแอกติวิตีของซีเตรทซินเนส และปีต้า-คีโตไทโอเลส ซึ่งส่งผลต่อการเจริญ และการผลิต P(3HB) ของ *B. megaterium* BA-019

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มผลผลิตของพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต) โดยการควบคุมวิถีชีวสังเคราะห์ใน *B. megaterium* BA-019



บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

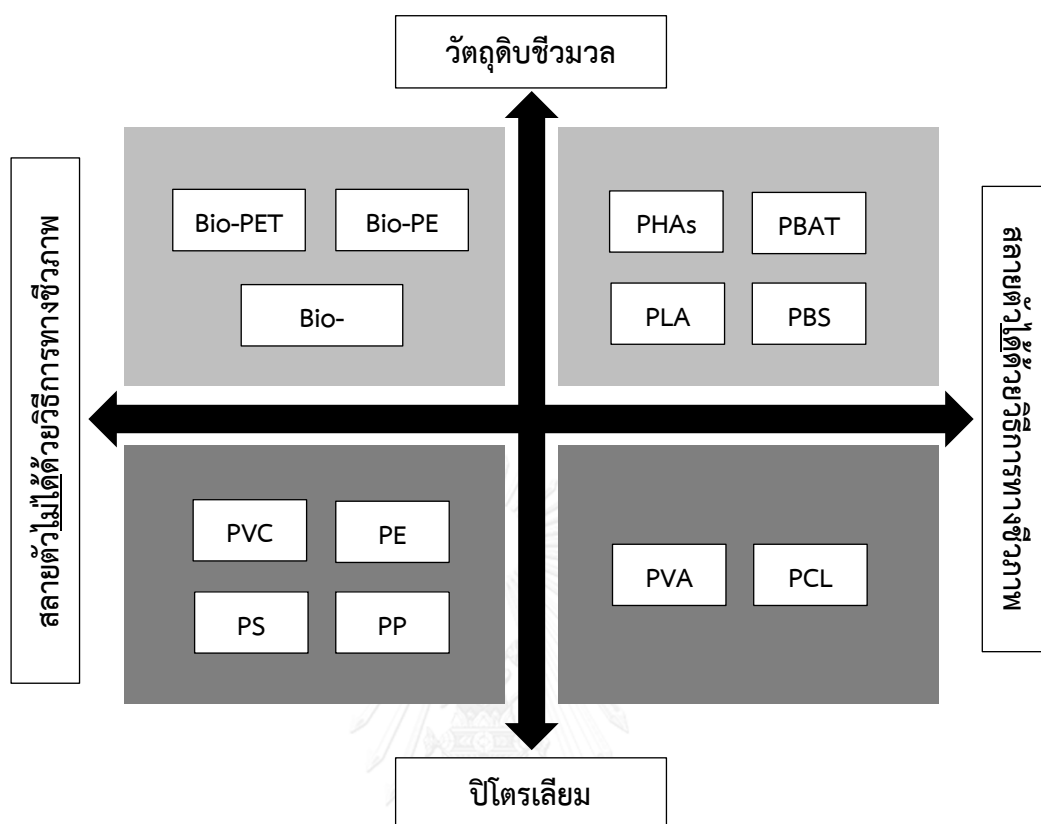
2.1 พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastics)

พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ หมายถึง พลาสติกที่สามารถถูกย่อยสลายได้ โดยเอนไซม์ที่เกิดจากจุลินทรีย์ในธรรมชาติ เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ สาหร่าย เป็นต้น พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

2.1.1 พลาสติกที่ย่อยสลายได้บางส่วน เช่น พอลิเอทิลีน (polyethylene) พอลิโพรพิลีน (polypropylene) และพอลิสไตรีน (polystyrene) เนื่องจากพลาสติกประเภทนี้เป็นพลาสติกสังเคราะห์ที่ใส่สารเติมแต่งทางธรรมชาติบางชนิด เช่น ข้าวโพด แป้ง เซลลูโลส และข้าว เป็นต้น ทำให้องค์ประกอบของพลาสติกมีขนาดเล็กลง เมื่ออนุภาคของสารเติมแต่งทางธรรมชาติถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ พลาสติกประเภทนี้จะอ่อนตัวลง มีความพรุนและมีพื้นที่ผิวมากขึ้น ซึ่งจะช่วยให้การทำลายร่างแหของพลาสติกได้ง่าย (Reddy และคณะ, 2003)

2.1.2 พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพอย่างสมบูรณ์ ได้แก่ พลาสติกชนิดเทอร์โมพอลิเอสเตอร์ที่ผลิตจากกระบวนการทางชีวภาพ พลาสติกประเภทนี้ถูกสร้างและสะสมโดยจุลินทรีย์บางชนิด และถูกจัดอยู่ในกลุ่มสารที่เรียกว่า โพลีไฮดรอกซีอัลคานอยด์ (polyhydroxyalkanoates หรือ PHAs ซึ่ง PHAs นี้มีคุณสมบัติของเทอร์โมพลาสติก คือ เมื่อได้รับความร้อนจะอ่อนตัว และเมื่อลดอุณหภูมิจะแข็งตัว ซึ่งสามารถนำมาขึ้นรูปและทำให้เป็นฟิล์ม แผ่น หรือไฟเบอร์ได้ นอกจากนี้พลาสติกประเภทนี้สามารถย่อยสลายโดยวิธีการทางธรรมชาติอย่างสมบูรณ์ได้เป็น คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) น้ำ (H₂O) และกรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) ซึ่งไม่ทำให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม (Reddy และคณะ, 2003; Chiellini และคณะ, 2008)

2.1.3 พลาสติกที่ย่อยสลายได้โดยแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV degradable plastics) พลาสติกประเภทนี้มีหมู่คาร์บอนิล (C=O) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีความไวต่อแสง UV สูง ทำให้เกิดการแตกตัวในสายโซ่ของพอลิเมอร์ ทำให้โมเลกุลของพลาสติกประเภทนี้เล็กลง จึงทำให้เอนไซม์ที่เกิดจากจุลินทรีย์ในธรรมชาติสามารถเข้าย่อยสลายได้บริเวณดังกล่าว ส่งผลให้พลาสติกจึงกรอบและแตกได้ (Reddy และคณะ, 2003)



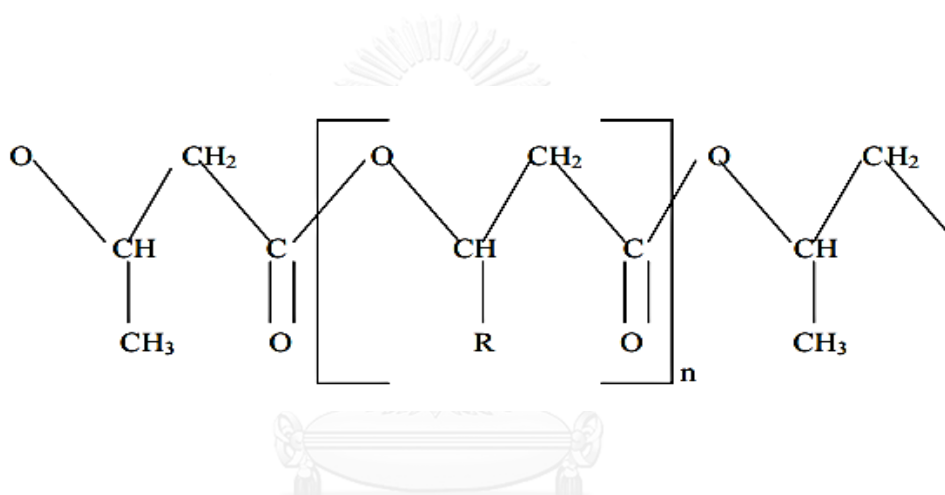
รูปที่ 1 การแบ่งประเภทของพลาสติก

2.2 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต หรือ PHAs เป็นพอลิเอสเตอร์ (polyesters) ชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในกลุ่มไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (hydroxyalkanoates) หรือ HAs (Ojumu และคณะ, 2003) ที่สามารถขึ้นรูปได้ด้วยความร้อน (thermoplastic) ซึ่งถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์จุลินทรีย์ทั้งโปรคาริโอต (prokaryote) และยูคาริโอต (eukaryote) เช่น *Bacillus megaterium* (Kulpreecha และคณะ, 2009), *Synechococcus* sp. (Asada และคณะ, 1999) เป็นต้น PHAs ที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นจะเก็บสะสมเป็นแกรนูล (granule) อยู่ในเซลล์ของจุลินทรีย์เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำรอง (storage material) ในภาวะที่มีการจำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ หรือออกซิเจน และมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไป โดยพลาสติกชีวภาพกลุ่มนี้สามารถถูกย่อยสลายได้ในธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ที่มีเอนไซม์ดีพอลิเมอร์เรส (depolymerase) และเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) ซึ่งการย่อยสลายด้วยวิธีการดังกล่าว จะให้สารที่ไม่เป็นอันตราย เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และกรดคาร์บอกซิลิก (Evans และ Sikdar, 1990)

2.2.1 โครงสร้างทางเคมีของ PHAs

PHAs เป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง (aliphatic polyester) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของมอนอเมอร์ตัวที่หนึ่งกับหมู่ไฮดรอกซีของมอนอเมอร์ตัวที่สองที่ตำแหน่งบีต้า-คาร์บอน ซึ่งเป็นไครัลคาร์บอน (chiral carbon) การเชื่อมต่อกันของมอนอเมอร์เป็นแบบหัวต่อหาง (head-to-tail configuration) โครงสร้างเป็น R-configuration ในรูปของ R-(3)-hydroxy fatty acid หรือ R- β -hydroxy fatty acid สำหรับหมู่ alkyl (R) อาจเป็นแบบพันธะไม่อิ่มตัว (unsaturated) แบบอะโรมาติก (aromatic) แบบฮาโลเจเนต (halogenate) หรือแบบแตกกิ่งก็ได้ (branched) (Steinbuchel และ Fuchtenbusch, 1998; Sudesh และคณะ, 2007) ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ PHAs (Kannan และ Rehacek, 1970)

เมื่อ $n=100-30,000$

เมื่อ $x=1$	เมื่อ R=ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีโพรพิโอเนต)	; P(3HP)
	เมื่อ R=เมทิล (CH ₃)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)	; P(3HB)
	เมื่อ R=เอทิล (C ₂ H ₅)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)	; P(3HV)
	เมื่อ R=โพรพิล (C ₃ H ₇)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต)	; P(3HHX)
	เมื่อ R=บิวทิล (C ₄ H ₉)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮปตะโนเอต)	; P(3HHP)
	เมื่อ R=เพนทิล (C ₅ H ₁₁)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต)	; P(3HO)
	เมื่อ R=เฮกซิล (C ₆ H ₁₃)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีนินาเอต)	; P(3HN)
	เมื่อ R=เฮปทิล (C ₇ H ₁₅)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีเดคาโนเอต)	; P(3HD)
	เมื่อ R=ออกซิล (C ₈ H ₁₇)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีอันเดคาโนเอต)	; P(3HUD)
	เมื่อ R=โนนิล (C ₉ H ₁₉)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีโดเดคาโนเอต)	; P(3HDD)
เมื่อ $x=2$	เมื่อ R=ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ พอลิ(4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)	; P(4HB)
เมื่อ $x=3$	เมื่อ R=ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ พอลิ(5-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)	; P(5HV)

2.2.2 การจัดจำแนกชนิดของ PHAs

สามารถจัดจำแนกชนิดของ PHAs ได้โดยใช้เกณฑ์ตามลักษณะต่างๆ เช่น จำนวนชนิดของมอนอเมอร์ ลักษณะการสังเคราะห์ทางชีวภาพ ชนิดของพอลิเอสเทอร์ที่สะสมภายในเซลล์ จุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การจำแนกประเภทของ PHAs ตามเกณฑ์ต่างๆ (Lenz และ Marchessault, 2005)

criteria for classification	types	description
1. monomer size	short-chain length (scl)	contains (C3-C5) carbon atoms
	medium-chain length (mcl)	contains (C6-C14) carbon atoms
	long-chain length (lcl)	contains (C15-C18) carbon atoms
2. biosynthetic origin	natural bioplastics	produced by microorganisms from general metabolites (e.g. PHAs)
	semi synthetic bioplastics	cannot be synthesised by the microbe and requires the addition to the culture broth of some precursors (e.g. PHAs containing aromatic monomers)
	synthetic bioplastics	obtained by chemical synthesis
3. number of monomers in the polyesters	homopolymeric bioplastic	contains single monomer unit
	heteropolymeric bioplastic (copolymer and terpolymers)	contains more than one monomer unit
4. type of polyesters accumulated by the microbe	unique	single bio-plastic
	more than one	mixed bio-plastics
5. chemical nature of the monomers	bioplastic containing aliphatic fatty acid derivatives	saturated or unsaturated monomers; linear or branched monomers; substituted or nonsubstituted
	bioplastics containing aromatic fatty acid derivatives	-
	bioplastics containing both aliphatic and aromatic fatty acid derivatives	-
	bioplastics containing other different compounds	e.g. poly- γ -glutamic acid, poly- ϵ -L-lysine, poly- β -L-malic acid

การจัดจำแนกประเภทของ PHAs ที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ

การจัดจำแนกตามจำนวนคาร์บอนอะตอม สามารถแบ่งได้ 3 ประเภท คือ

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่สั้น (short-chain length PHAs หรือ scl-PHAs) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยคาร์บอนในหน่วยมोनอเมอร์จำนวน 3-5 อะตอม เช่น P(3HB) และ P(3HV) เป็นต้น

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่ปานกลาง (medium-chain length PHAs หรือ mcl-PHAs) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยคาร์บอนในหน่วยมोनอเมอร์จำนวน 6-14 อะตอม เช่น P(3HHX), P(3HO) และ P(3HDD) เป็นต้น

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่ยาว long-chain length PHAs หรือ lcl-PHAs) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยคาร์บอนในหน่วยมोनอเมอร์จำนวนมากกว่า 14 อะตอม

การจัดจำแนกตามชนิดของมोनอเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสายพอลิเมอร์ PHAs สามารถแบ่งได้ 2 ประเภท คือ

โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่มีมोनอเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อกัน เช่น P(3HB)

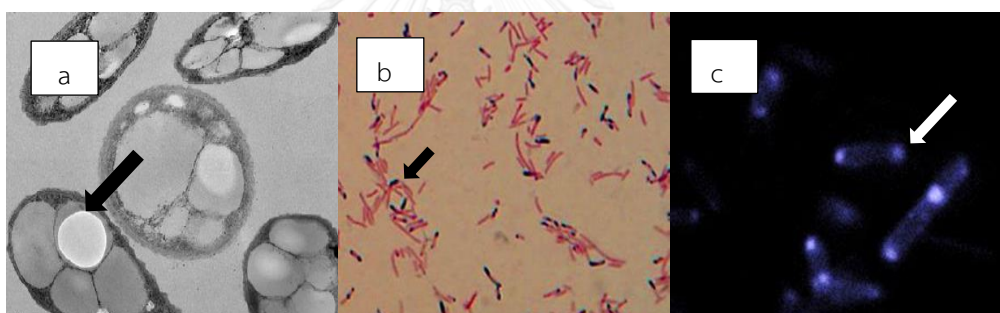
เฮเทอโรพอลิเมอร์ (heteropolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่มีมोनอเมอร์มากกว่า 1 ชนิดมาต่อกัน โดยเรียกชื่อตามจำนวนมोनอเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ ดังนี้

โคพอลิเมอร์ (copolymer) ประกอบด้วยมोनอเมอร์ 2 ชนิดต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาลูเอเรต) หรือ P(3HB-co-3HV) หรือ PHBV

เทอร์พอลิเมอร์ (terpolymer) ประกอบด้วยมोनอเมอร์ 3 ชนิดมาต่อเป็นสารพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาลูเอเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ P(3HB-co-3HV-co-4HB)

2.3 พอลิ-บีต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly- β -hydroxybutyrate)

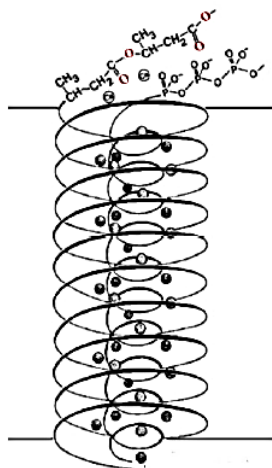
พอลิ-บีต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly- β -hydroxybutyrate) มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ poly(3-hydroxybutyrate) หรือ P(3HB) เป็นพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง จัดเป็นพอลิเมอร์สายสั้นที่อยู่ในกลุ่ม PHAs มีคุณสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติก และสามารถย่อยสลายได้เองโดยวิธีการทางชีวภาพด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม ผลจากการย่อยสลายจะได้ชีวมวล น้ำ แก๊สมีเทน และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (พบว่า P(3HB) จะถูกย่อยสลายได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และความชื้น 55%) อีกทั้งคุณสมบัติทางกายภาพใกล้เคียงกับพลาสติกที่ผลิตจากปิโตรเคมี (Balaji และคณะ, 2013) เมื่อจุลินทรีย์สังเคราะห์ P(3HB) จะถูกเก็บสะสมอยู่ในแกรนูลภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ ซึ่งแกรนูลถูกหุ้มด้วยเมมเบรนที่มีชั้นไขมันและโปรตีนหนาประมาณ 2 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.2-0.5 ไมโครเมตร สามารถตรวจหา P(3HB) ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์เบื้องต้นได้ด้วยเทคนิคการย้อมไขมันด้วยสีย้อมไนล์ บลู เอ (Nile Blue A) หรือสีซูดาน แบล็ก บี (Sudan black B) แสดงในรูป 3



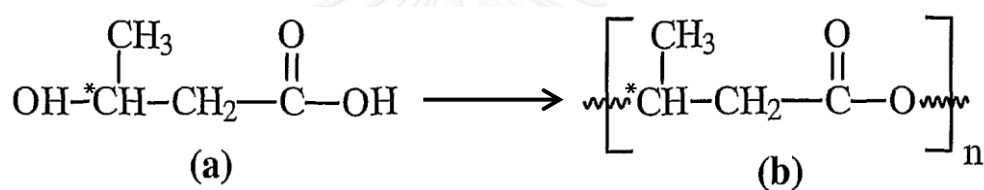
รูปที่ 3 ลักษณะของ P(3HB) แกรนูลของ *C. necator* สายพันธุ์ A-04 (a) (Chanprateep, 2010), เซลล์ที่ย้อมด้วยสีซูดาน แบล็ก บี (b) (Jari และคณะ, 2015), เซลล์ที่ย้อมด้วยสีไนล์ บลู เอ (c) (Rehm, 2003)

2.3.1 โครงสร้างของ P(3HB)

เมื่อศึกษาด้วยเทคนิค X-ray diffraction พบว่าโครงสร้างโมเลกุลของ P(3HB) มีลักษณะเป็นเกลียวเวียนขวา (right-handed helix) และอัดตัวแน่น มีความยาวหนึ่งรอบเกลียวเท่ากับ 6 อังสตรอม มีน้ำหนักโมเลกุล 10^3 - 10^6 ดาลตัน (Reusch, 2013) แสดงในรูป 4 ซึ่งเกิดจากการเชื่อมต่อกันของ 3HB ที่มีหมู่เมทิล (methyl group) มาต่อสายพอลิเมอร์หลักที่ตำแหน่งคาร์บอน (*C) และมีมอนอเมอร์เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ ได้สารประกอบ P(3HB) แสดงในรูป



รูปที่ 4 ภาพวาดโครงสร้างผลึกของ P(3HB) (Reusch, 2013)



รูปที่ 5 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ 3-hydroxybutyrate (a) และ P(3HB) (b) (Nascimento และคณะ, 2007)

2.3.2 สมบัติทางกายภาพและความร้อนของ P(3HB)

P(3HB) เป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ จึงสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด เช่น คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรเอซีเทต ไดคลอโรมีเทน เป็นต้น แต่ P(3HB) ไม่สามารถละลายได้ในสารละลายมีขั้ว ได้แก่ น้ำ เมทานอล และเอทานอล ดังแสดงในตารางที่ 2 P(3HB) มีความหนาแน่นอยู่ในช่วง 1.171-1.260 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ส่วนจุดหลอมเหลวจะอยู่ในช่วง 157-188 องศาเซลเซียส โดยเมื่อผลึกเย็นลงอย่างช้าๆ หลังจากการหลอมเหลวจะได้เป็นสเฟียรูไลต์ (spherulites) ขนาดใหญ่ ทำให้ P(3HB) มีสถานะเป็นของแข็งคล้ายแก้ว (glass state) ที่อุณหภูมิกลาสทรานสิชัน (glass transition) ประมาณ 4 องศาเซลเซียส และหากตกตะกอน P(3HB) ด้วยสารละลายเจือจางจะได้ผลึกเป็นชั้นบางๆ ซึ่งความหนาแน่นของชั้นผลึกจะขึ้นกับอุณหภูมิในการเกิดผลึก (crystallization temperature) และน้ำหนักโมเลกุลของ P(3HB) นอกจากนี้จะเห็นว่าค่า Young's modulus และค่าความทนแรงดึง (tensile strength) ของ P(3HB) มีความใกล้เคียงกับพอลิพรอพิลีน ซึ่งเป็นพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 สมบัติการละลายของ P(3HB) (Chen และคณะ, 1991)

ละลายได้ดีมาก	ละลายได้ดี	ละลายไม่ได้
คลอโรฟอร์ม	ไดโอเซน	น้ำ
ไดคลอโรฟอร์ม	ออกทานอล	เมทานอล
ไดคลอโรอะซิเตต	โทลูอิน	เอทานอล
ทรีโอลีน	ฟิรดิน	1-โพรพานอล
เอทิลีนคาร์บอเนต		2-โพรพานอล
โพรพิลีนคาร์บอเนต		กรดเกลือแร่เจือจาง
ทรีฟลูโอโรเอทานอล		อัลคาไลน์ไฮเปอร์คลอไรด์
แอสติกแอนไฮไดรด์		ไดเอทิลอีเทอร์
โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล		เอทิลีนอะซิเตต
ไดเมทิลฟอร์มามิน		เอทิลเมทิลคีโตน
เอทิลอะซิโตอะซิเตต		เททราไฮโดรฟูราน
ได-,ไตร-,เททรา-คลอโรอีเทน		เอทิลโพรมีเอต
กรดอะซิติก		เฮกเซน
แอลกอฮอล์ (คาร์บอน>3อะตอม)		

ตารางที่ 3 สมบัติทางกายภาพและความร้อนของ P(3HB) เปรียบเทียบกับพอลิพรอพิลีน (Doi, 1990)

สมบัติ	P(3HB)	PP
จุดหลอมเหลว (°C)	171-182	171-186
ความสามารถเป็นผลึก (%) (crystallinity)	65-80	65-70
ความหนาแน่น (g/cm ³)	1.23-1.25	0.94-0.95
น้ำหนักโมเลกุล ($\times 10^5$)	1-8	2.2-7
การกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight distribution)	2.2-3	5-12
ความแข็ง (GPa) (flexural modulus)	3.5-4	2.7
ความสามารถในการต้านแรงดึง (MPa) (tensile strength)	40	39
ความสามารถในการขยายตัว (%) (extension to break)	6-8	400
ความทนต่อแสงอุลตราไวโอเลต (UV resistance)	ดี	ไม่ดี
ความทนต่อตัวทำละลาย	ไม่ดี	ดี
ความสามารถให้ออกซิเจนผ่าน (cm ³ m ⁻² atm ⁻¹ d ⁻¹) (oxygen permeability)	45	1,700

2.3.3 จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้

ในธรรมชาติมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ แต่มีจุลินทรีย์ไม่กี่ชนิดที่สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ในปริมาณสูง จุลินทรีย์ชนิดนั้นคือแบคทีเรีย เช่น *Cupriavidus necator* (*Ralstonia eutropha* หรือ *A. eutrophus*) เป็นแบคทีเรียที่มีการศึกษามากที่สุด และมีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพเพื่อสามารถผลิต P(3HB) ได้ในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียชนิดอื่นๆที่สามารถสังเคราะห์ P(3HB) ได้ เช่น *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Alcaligenas* sp., *Escherichia coli*, *Halomonas boliveiensis* เป็นต้น (Brandl และคณะ, 1990) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) (Brandl และคณะ, 1990)

การจำแนกสายพันธุ์ใน Bergey's Manual	จีโนส	ปริมาณ P(3HB) สูงสุด (%ต่อน้ำหนักเซลล์ แห้ง)	แหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิต P(3HB)
Group 1:	<i>Chloroflexus</i>	<1	yeastextract
Phototrophic bacteria	<i>Chromatium</i>	20	acetate
	<i>Ectothiorhodospira</i>	ND	NS
	<i>Lamprocystis</i>	47	NS
	<i>Rhodospirium</i>	80	acetate
	<i>Rhodobacter</i>	ND	acetate
	<i>Thiocapsa</i>	ND	NS
	<i>Thiocystis</i>	ND	NS
	<i>Thiodictyon</i>	ND	NS
	<i>Thiopedia</i>	ND	NS
	<i>thiosphaera</i>	ND	acetone/CO ₂
Group 2:	<i>Beggiatia</i>	57	acetat
Glinding bacteria	<i>Leptothrix</i>	67	pyruvate
	<i>Sphacrotilus</i>	45	glucose/peptone

การจำแนกสายพันธุ์ใน Bergey's Manual	จีโนส	ปริมาณ P(3HB) สูงสุด (%ต่อน้ำหนักเซลล์ แห้ง)	แหล่งคาร์บอนสำหรับ การผลิต P(3HB)
Group 3: Sheathed bacteria	<i>Caulbacter</i>	36	glucose/glutamate
	<i>Azospirillum</i>	75	malate
	<i>Oceanospirillum</i>	ND	NS
	<i>Spirillum</i>	40	lactate
Group 4: Budding and/or Curved bacteria	<i>Alcaligenes</i>	96	fructose
	<i>Azotobacter</i>	73	glucose
	<i>Beijerinckia</i>	38	glucose
	<i>Dexia</i>	26	methanol
	<i>Methylobacterium</i>	47	methanol
	<i>Methylosinus</i>	25	methanol
	<i>Pseudomonas</i>	67	methanol
	<i>Rhizobium</i>	57	NS
	<i>Xanthobacter</i>	ND	yeast extract/casamina
Group 9: Gram-negative anaerobic bacteria	<i>Syntrophomonas</i>	30	gluconate
Group 10: Gram-negative cocci and cocibacilli	<i>Acinetobacter</i>	<1	glucose
	<i>Lampropedia</i>	ND	NS
	<i>Moraxella</i>	ND	NS
	<i>Paracoccus</i>	ND	NS
Group 12: Gram-negative chemolithotrophic	<i>Nitrobacter</i>	ND	NS
	<i>Nitrococcus</i>	ND	NS
	<i>Thiobacillus</i>	ND	glucose
Group 13: Archaeobacteria	<i>Halobacterium</i>	38	glucose
Group 14: Gram-positive cocci	<i>Micrococcus</i>	28	Peptone/trytone
Group 15: Endospore-forming rods and cocci	<i>Bacillus</i>	25	Glucose
	<i>Clostridium</i>	13	trytone/peptone/glucose

การจำแนกสายพันธุ์ใน Bergey's Manual	จีนัส	ปริมาณ P(3HB) สูงสุด (%ต่อน้ำหนักเซลล์ แห้ง)	แหล่งคาร์บอนสำหรับ การผลิต P(3HB)
Cyanobacteria	<i>Aphanothece</i>	<1	NS
	<i>Chlorogloea</i>	10	Acetate/CO ₂
	<i>Gamphosphaeria</i>	ND	NS
	<i>Microcoleus</i>	<1	NS
	<i>Microcystis</i>	ND	NS
	<i>Spirulina</i>	6	CO ₂

หมายเหตุ ND=ปริมาณ P(3HB) สูงสุดไม่ได้ทำการวิเคราะห์, NS=แหล่งคาร์บอนไม่จำเพาะ

2.3.4 การสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดย *Bacillus* spp.

แบคทีเรียที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับการผลิต P(3HB) ในระดับอุตสาหกรรม คือ *C. necator* (*Alcaligenes eutrophus*) และ *A. latus* เนื่องจากแบคทีเรียทั้งสองชนิดสามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้มากถึง 80% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่แบคทีเรียทั้งสองชนิดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนมากมีเอนโดทอกซิน (endotoxin) อยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทลิพอโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide หรือ LPS) ไม่เหมาะที่จะนำแบคทีเรียในกลุ่มนี้ไปใช้ในการสังเคราะห์ P(3HB) เพื่อใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ หรือผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับอาหาร (López และคณะ, 2012) ในทางตรงกันข้ามแบคทีเรียแกรมบวกไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก ซึ่งเป็นสมบัติที่ดีต่อการสังเคราะห์ P(3HB) ในระดับอุตสาหกรรม กลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ เช่น *Corynebacterium* spp. (Haywood และคณะ, 1991) *Nocardia* spp. (Valentin และ Dennis, 1996), *Rhodococcus* spp. (Haywood และคณะ, 1991) *Streptomyces* spp. (Kannan และ Rehacek, 1970) และ *Bacillus* spp. (Labuzek และ Radecka, 2001; McCool และ Cannon, 2001) *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีการศึกษาและพัฒนาจำนวนมาก ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 *Bacillus* spp. ที่สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ (Valappil และคณะ, 2007)

แบคทีเรีย (<i>Bacillus</i> spp.)	P(3HB) content (% by wt.)	แหล่งคาร์บอน
<i>Bacillus</i> sp. JMa5	35.0	molasses
<i>B. circulans</i> DSM 1529	43.7	acetate, 3- hydroxybutyrate
<i>B. brevis</i>	32.1	sucrose
<i>B. sphaericus</i>	30.2	sucrose
<i>B. licheniformis</i> DSM394	25.8	acetate, 3- hydroxybutyrate
<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM7	17.0	acetate, 3- hydroxybutyrate
<i>B. megaterium</i> DSM90	47.2	acetate, 3- hydroxybutyrate
<i>B. cereus</i> ATCC14579	2.2.0	hexanoate
<i>B. mycoides</i> RLJB-107	69.4	sucrose

Lemoigne (1926) พบว่า *B. megaterium* สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ ในระยะเวลาต่อมาจึงได้มีการศึกษาใน *Bacillus* ในสปีชีส์อื่นๆเพิ่มมากขึ้น Chen และคณะ (1991) ได้รายงานผลของการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ใน *Bacillus* ในสปีชีส์ต่างๆ เมื่อมีการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 2 ขั้นตอนโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ขั้นตอนแรกให้แบคทีเรียเจริญในอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์ (nutrient rich medium) จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารที่ขาดแหล่งไนโตรเจน (N-free medium) เพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) พบว่าเมื่อแบคทีเรียเจริญในอาหารที่สมบูรณ์ จะมีการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้น้อย แต่เมื่อควบคุมการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้อยู่ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไปและจำกัดแหล่งไนโตรเจน พบว่าแบคทีเรียสามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) เพิ่มมากขึ้น McCool และคณะ (1996) ได้ทำการศึกษากการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ใน *B. megaterium* พบว่ามีการสังเคราะห์และสะสมสูงสุดในช่วง late log phase และในช่วง early stationary phase Labuzek และ Radecka (2001) รายงานว่า *B. cereus* สายพันธุ์ UW85 สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ในปริมาณ 25% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

งานวิจัยนี้ได้ใช้เชื้อ *B. megaterium* BA-019 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้ใหม่โดยคณะผู้วิจัย ต่อมามีการศึกษาวิจัยจนได้ภาวะที่ดีที่สุดในการเพาะเลี้ยงเชื้อและการสังเคราะห์ P(3HB) โดยได้ทราบถึงกระบวนการเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพ และได้ปริมาณของเซลล์และผลผลิตสูง (Kulpreecha และคณะ, 2009)

รัตนศิริ มุทิตากุล (2538) ได้คัดกรองจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้จำนวน 30 ชนิด พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BA-019 สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ในปริมาณที่มากกว่าสายพันธุ์อื่น จากนั้น อติพล บุญเรืองถาวร (2543) ทำการศึกษาการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว พบว่า ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กากน้ำตาลและยูเรียซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีราคาถูก ค่า pH เท่ากับ 6.0 อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 25 โมลต่อโมล เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 แบบเฟด-แบตช์ที่มีการควบคุมการป้อนสารอาหารด้วยวิธี pH-stat โดยการใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 400 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 โมลต่อโมลในสารป้อนเข้าสู่ระบบในชั่วโมงที่ 7.5 ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 72.57 กรัมต่อลิตร ปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 30.52 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 42.06% โดยน้ำหนัก ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และมีอัตราการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) เท่ากับ 1.27 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

กฤษมา กมลจรัสโสภา (2547) ได้จัดจำแนกสปีชีส์ของ *Bacillus* sp. BA-019 โดยทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางชีวเคมี และ 16S rDNA พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 คือ *B. megaterium*

บุญฤทธิ์ เมฆศิริพร (2551) ศึกษาปัจจัยที่สำคัญต่อการขยายส่วนการผลิต P(3HB) โดย *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร พบว่าปริมาณของเซลล์ ปริมาณ P(3HB) ผลผลิตของเซลล์ที่ได้ต่อหน่วยซับสเตรทที่ใช้ไป (YX/S) ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อซับสเตรทที่ใช้ไป (YP/S) และอัตราการผลิต P(3HB) มีค่ามากที่สุดเมื่อมีอัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที (VVM) และใช้ภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวในการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในการผลิต P(3HB) แบบเฟด-แบตช์ โดยการป้อนอาหารแบบ exponential feeding ในถังหมักขนาด 10 ลิตร พบว่ามีปริมาณของเซลล์ ปริมาณ P(3HB) และอัตราการผลิต P(3HB) มีค่าเท่ากับ 90.42 กรัมต่อลิตร 35.45 กรัมต่อลิตร และ 1.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ที่ชั่วโมงที่ 27 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นได้

ทำการศึกษา อัตราส่วนของกำลังมอเตอร์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ (P/V) ความเร็วรอบปลายใบพัด (TnDi) และค่าเรย์โนลด์นัมเบอร์ (NRE) เพื่อใช้ในการขยายส่วนการผลิต P(3HB) จากถังหมักขนาด 10 ลิตร ไปสู่ถังหมักขนาด 300 ลิตร โดยพบว่าปริมาณ P(3HB) และอัตราการผลิต P(3HB) มีค่าน้อยกว่าการผลิต P(3HB) ในถังหมักขนาด 10 ลิตร

ปวดี กาญจนชุมพล (2553) ศึกษาการขยายส่วนการผลิต P(3HB) จากถังหมักขนาด 10 ลิตร ไปสู่ถังหมักขนาด 90 ลิตร พบว่าในการผลิตในถังหมักขนาด 10 ลิตรแบบเฟด-แบตช์แบบ exponential feeding ความเข้มข้นของน้ำตาลในกากน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร และยูเรียเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร และใช้กากน้ำตาลและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลทั้งหมดต่อยูเรีย) เป็นสารอาหารที่ใช้ป้อนเข้าระบบที่ชั่วโมงที่ 12 ได้ปริมาณเซลล์ ความเข้มข้นของ P(3HB) และอัตราการผลิต P(3HB) เท่ากับ 90.71 กรัมต่อลิตร 41.58 กรัมต่อลิตร และ 1.73 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ สำหรับการขยายส่วนการผลิตสู่ถังหมักขนาด 90 ลิตร โดยอาศัยข้อมูลด้านเทคนิคการหมักและภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อทั้งแบบแบตช์และเฟด-แบตช์ในถังหมักขนาด 10 ลิตร เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการหมักทั้ง 2 ระดับ (10 ลิตร และ 90 ลิตร) พบว่า ความเร็วรอบปลายใบพัดเป็นปัจจัยทางวิศวกรรมที่เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้เป็นเกณฑ์คงที่ในการขยายส่วนการผลิต P(3HB) จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ

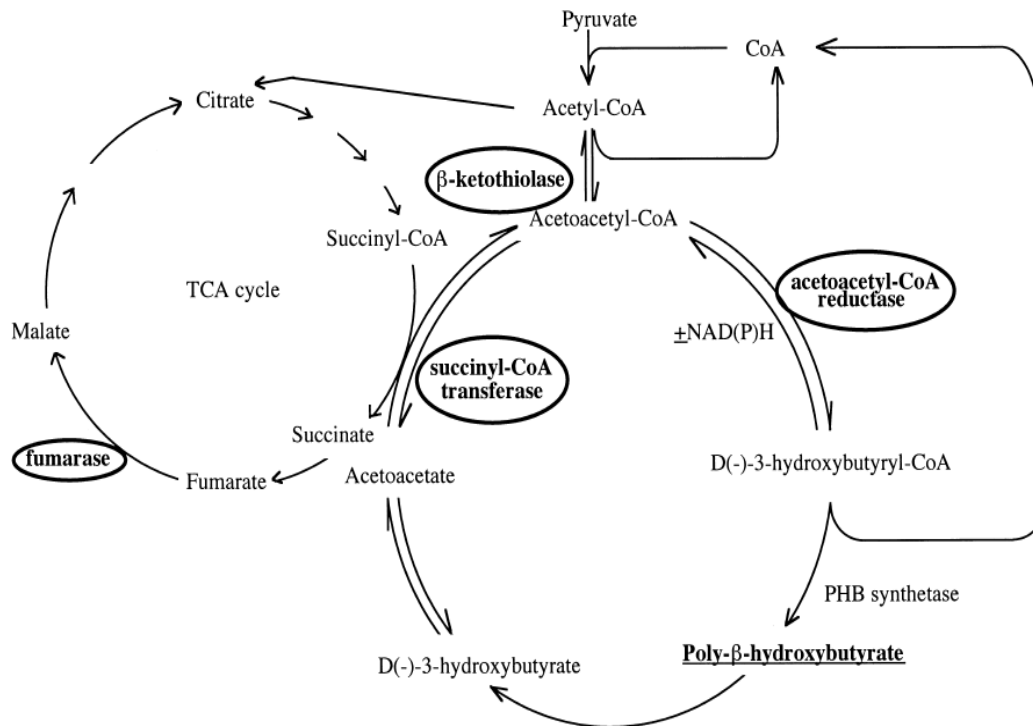
สุชฎทัย พันศิริพัฒน์ (2556) ศึกษาและพัฒนากระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของ P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 ด้วยการใช้สารเคมีที่มีราคาไม่แพง และมีประสิทธิภาพต่อการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ ผลการศึกษาพบว่า การใช้เซลล์แห้งในกระบวนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ วิธีที่ดีที่สุดคือ การพรีทริทเมนต์ด้วยการบ่มเซลล์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง และนำไปเข้าสู่กระบวนการพอลิซิงด้วยเอทานอลเย็นความเข้มข้น 20% ปริมาตรต่อปริมาตร โดยวิธีนี้ได้ความบริสุทธิ์และการกู้คืนเท่ากับ 88% และ 96.31% โดยน้ำหนักตามลำดับ และน้ำหนักโมเลกุลของ P(3HB) เท่ากับ 263,766 ดาลตัน สำหรับการให้เซลล์เปียกในกระบวนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ วิธีที่ดีที่สุดคือ การทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการเชิงกล โดยใช้ LAS-99 ความเข้มข้น 5% น้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยคลื่นความถี่สูง (ultrasonication) ที่ความถี่ 40% แอมพลิจูด

เป็นเวลา 10-20 นาที แล้วนำไปเข้าสู่กระบวนการพอลิซิงด้วยเอทานอลเย็นความเข้มข้น 20% ปริมาตรต่อปริมาตร โดยวิธีนี้พบว่ามีความบริสุทธิ์และการกักเก็บเท่ากับ 95.27% และ 99.01% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และน้ำหนักโมเลกุลของ P(3HB) เท่ากับ 88,844 ดาลตัน

2.3.6 วิธีชีวสังเคราะห์ของ P(3HB)

ในภาวะปกติ จุลินทรีย์จะทำการแคแทบอลิซึมสารคาร์โบไฮเดรตผ่านวิถี Entner-Doudoroff หรือวิถี Embden Meyerhof Parnas ไปเป็นไพรูเวต (pyruvate) ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นอะเซทิล-โคเอ (acetyl-CoA) โดยปฏิกิริยาดีไฮโดรจิเนชัน (dehydrogenation) ดังนั้นอะเซทิล-โคเอจะเข้าสู่วิถีไตรคาร์บอกซิลิก แอซิด (tricarboxylic acid หรือ TCA) ด้วยการปล่อย CoASH และถูกออกซิไดซ์ได้คาร์บอนไดออกไซด์ พลังงานในรูป ATP และ reducing equivalents ได้แก่ $\text{NADH}+\text{H}^+$, $\text{NADPH}+\text{H}^+$ และ FADH_2 จุลินทรีย์จะนำพลังงานและสารตั้งต้นที่ได้ไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนต่อไป (Harvey และคณะ, 2011) แต่ในภาวะที่มีสารอาหารไม่สมดุล คือ มีปริมาณสารอาหารบางชนิดจำกัดหรือขาดสารอาหารชนิดนั้น เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส หรือ trace elements (เช่น เหล็ก แคลเซียม แมกนีเซียม เป็นต้น) แต่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป จะมีผลทำให้เกิดการสังเคราะห์ P(3HB)

การสังเคราะห์ P(3HB) และการควบคุมการสังเคราะห์ P(3HB) เกิดโดยผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม ซึ่งสารตั้งต้นของวิถีการสังเคราะห์ P(3HB) คือ อะเซทิล-โคเอ โดยมีระบบของเอนไซม์ 3 ชนิด คือ บิต้า-คีโตไทโอเลส (β -ketothiolase) เป็นเอนไซม์ชนิดแรกที่ใช้เร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของอะเซทิล-โคเอ 2 โมเลกุล ให้เป็นอะเซโตอะเซทิล-โคเอ (acetoacetyl-CoA) จากนั้นอะเซโต-อะเซทิล-โคเอจะถูกรีดิวซ์เป็น ดี(-)-3-ไฮดรอกซีบิวทิрил-โคเอ (D(-)-3-hydroxybutyryl-CoA) โดยการเร่งปฏิกิริยาของแอซีโตแอซีทิล-โคเอ รีดักเทส (acetoacetyl-CoA reductase) และปฏิกิริยาสุดท้ายคือ ปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ของมอนอเมอร์ 3HB เป็น P(3HB) โดยพีเอชบี ซินเทส (P(3HB) synthase) (Wu และคณะ, 2001; Luengo และคณะ, 2003; Singh และคณะ, 2009) วิธีชีวสังเคราะห์ของ P(3HB) แสดงในรูป 6



รูปที่ 6 วิธีชีวสังเคราะห์ P(3HB) (Wu และคณะ, 2001)

โดยทั่วไปแล้ว การสังเคราะห์และการสะสม P(3HB) ของจุลินทรีย์จะเกิดขึ้นสูงหลังจากการเจริญของจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะคงตัว (stationary phase) และจุลินทรีย์จะต้องอยู่ภายใต้ภาวะการเติบโตที่มีสารอาหารไม่สมดุล จากอะเซทิล-โคเอที่ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแหล่งคาร์บอนจะถูกแมบอไลต์ต่อไปเป็นสารมัธยันตร์ (intermediate) ในวิถี TCA และ อะเซทิล-โคเอ สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ P(3HB) ในภาวะที่มีสารอาหารสมดุล อะเซทิล-โคเอจะถูกเปลี่ยนเป็นพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญ รวมทั้งปล่อย CoASH อิสระออกมา หากมี CoASH อิสระมากเกินไปจะส่งผลให้ยับยั้งการทำงานของ บิต้า-คีโตไทโกลเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกที่ใช้ในการสังเคราะห์ P(3HB) ทำให้ CoASH อิสระไม่เข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ P(3HB) แต่เมื่อจุลินทรีย์อยู่ภายใต้ภาวะการเติบโตที่มีสารอาหารไม่สมดุล คือ มีปริมาณสารอาหารบางชนิดจำกัดหรือขาดสารอาหารชนิดนั้น เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส หรือ trace elements (เช่น เหล็ก แคลเซียม แมกนีเซียม เป็นต้น) แต่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป จะมีผลทำให้เกิดการสังเคราะห์ P(3HB) ขึ้น เนื่องจากภาวะนี้ทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์ NADH oxidase ลดลง (NADH oxidase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ NADH ไปเป็น NAD^+) ทำให้ปริมาณ NADH เพิ่มขึ้น ปริมาณ NADH ที่เพิ่มมากขึ้นจะมีผลยับยั้งการทำงานของซิเตรท ซินเทส (citrate synthase) ซึ่งเป็น

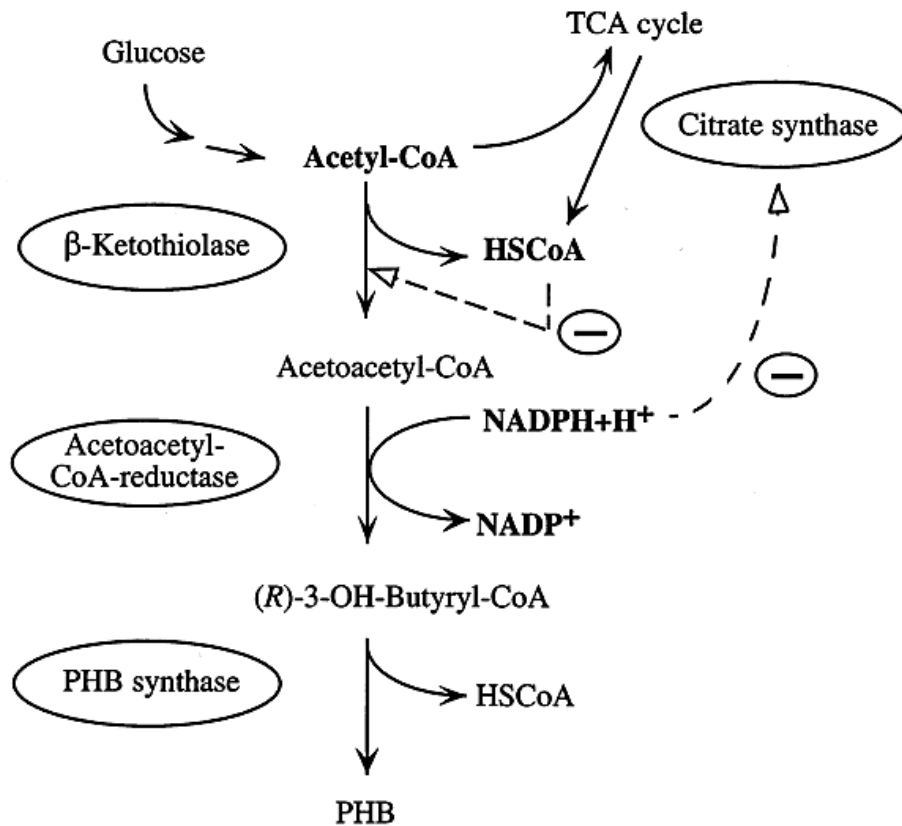
เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนอะเซทิล-โคเอไปเป็น citrate ในวิถี TCA เมื่อเอนไซม์ชนิดนี้ถูกยับยั้ง จึงทำให้มีปริมาณอะเซทิล-โคเอเพิ่มมากขึ้นถึงระดับที่ทำให้ผลการยั้งยั้งของ CoASH อีสระต่อ ปีต้า-คีโตไทโอเลส หดไป การสังเคราะห์ P(3HB) จึงเกิดขึ้นได้ (Griebel และคณะ, 1968; Pardelha และคณะ, 2012)

2.3.7 การควบคุมวิถีชีวสังเคราะห์ P(3HB)

การศึกษาในด้านต่างๆของ P(3HB) ทั้งด้านกายภาพและเคมี รวมไปถึงชนิดของ จุลินทรีย์ กระบวนการหมัก กระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ ได้มีการศึกษาและพัฒนากันอย่างแพร่หลายในหลายปีที่ผ่านมา แต่ในการศึกษาการควบคุมวิถีชีวสังเคราะห์ยังมีอยู่ไม่มาก Kessler และ Witholt (2001) ศึกษาพบว่า การควบคุมวิถีชีวสังเคราะห์ของ P(3HB) สามารถทำได้ใน 4 ระดับ คือ 1. การควบคุมในระดับเอนไซม์ 2. การควบคุมในระดับทรานสคริปชัน (transcription) 3. การควบคุมการย่อยสลาย P(3HB) หรือ 4. การใช้การควบคุมในระดับต่างๆร่วมกัน

2.3.7.1 การควบคุมการสังเคราะห์ P(3HB) ในระดับเอนไซม์

ในแบคทีเรียส่วนใหญ่ เช่น *Ralstonia eutropha* การสังเคราะห์ P(3HB) เกิดจากปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน โดยมีสารตั้งต้นคือ อะเซทิล-โคเอ และปลดปล่อย CoASH อีสระออกมา ในปฏิกิริยาสุดท้าย เมื่อมีคาร์โบไฮเดรต ไพรูเวต หรืออะซิเตรท เป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นอะเซทิล-โคเอ และ CoASH อีสระจึงมีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมการสังเคราะห์ P(3HB) เนื่องจากหากมีปริมาณ CoASH มากเกินไป ปีต้า-คีโตไทโอเลส จะถูกยับยั้งทำให้ อะเซทิล-โคเอ ไม่เข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ P(3HB) (Senior และ Dawes, 1971) นอกจากนี้ซิเตรท ซินเทส สามารถถูกยับยั้งโดย NADH และ NADPH ที่ถูกปล่อยออกมาหลังจากเกิดการสังเคราะห์ P(3HB) ด้วยเหตุผลนี้จึงทำให้ซิเตรท ซินเทส มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์ P(3HB) ทั้งกระบวนการ โดยขึ้นอยู่กับ การควบคุมปริมาณของ CoASH (Henderson และ Jones, 1997)



รูปที่ 7 วิธีชีวสังเคราะห์ P(3HB) ของ *R. eutropha* และการควบคุมวิธีชีวสังเคราะห์ (Kessler และ Witholt, 2001)

ในขั้นตอนการสังเคราะห์ P(3HB) ทั้ง 3 ขั้นตอน ปีต้า-คีโตไทโอะเลส จะเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของอะเซทิล-โคเอ 2 โมเลกุล ให้เป็นอะเซโตอะเซทิล-โคเอ ปีต้า-คีโตไทโอะเลสจะไม่ทำการเร่งปฏิกิริยาเมื่อมี CoASH (เป็นผลิตภัณฑ์ที่ถูกปล่อยออกมาหลังจากอะเซทิล-โคเอ เข้าสู่วิถี TCA ในภาวะที่ไม่มีการขาดสมดุลของสารอาหาร) ในปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2 เป็นอะเซโตอะเซทิล-โคเอจะถูกแคตาไลต์ด้วยแอซิโตแอซิทิล-โคเอ ริดักเทส ไปเป็นอาร์(-)-3-ไฮดรอกซีบิวทิล-โคเอ และปล่อย NADPH และ NADH ออกมา ซึ่งสารสองชนิดนี้มีผลในการยับยั้งซิเตรท ซินเทส ในวิถี TCA ไม่ให้ทำงาน จึงทำให้แอซิทิล-โคเอเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ P(3HB) เพิ่มมากขึ้น และปฏิกิริยาสุดท้ายคือปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันเป็น P(3HB) โดยพีเอชบี ซินเทส (Kessler และ Witholt, 2001) ดังแสดงในรูป

2.3.7.2 การควบคุมการสังเคราะห์ P(3HB) ในระดับทรานสคริปชัน

ได้มีการศึกษายีน (gene) ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์ P(3HB) พบว่าเป็นยีน *pha* และ *phb* (Huisman และคณะ, 1991; Liebergesell และ Steinbuchel, 1992; Timm และ Steinbuchel, 1992) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาจำนวนมากเกี่ยวกับการควบคุมการแสดงออกของยีน *pha* ซึ่งเกี่ยวข้องกับ การสังเคราะห์ P(3HB)

ตารางที่ 6 แสดงโปรตีนควบคุม (regulatory protein) ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ P(3HB)

โปรตีนควบคุม	กลุ่มของโปรตีนควบคุม	จุลินทรีย์
PhaF	histone H1-like	<i>Pseudomonas oleovorans</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas putida</i>
PhaR _{Ps}	AraC:XylS	<i>Pseudomonas</i> sp. 61-3
PhaR _{Pd}	-	<i>Paracoccus denitrificans</i>
PhaS	two component systems	<i>Pseudomonas putida</i>
GacS	two component systems	<i>Azotobacter vinelandii</i>
NtrB:NtrC	two component systems	<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7
LuxR	quorum senser	<i>Vibrio harveyi</i>

2.3.7.3 การควบคุมการดีพอลิเมอร์ไรเซชัน P(3HB)

Doi และคณะ (1992) พบว่า พี(3เอชบี) ดีพอลิเมอร์เลส (P(3HB) depolymerase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่คะตะไลซ์ปฏิกิริยาดีพอลิเมอร์ไรเซชันสาร P(3HB) มีแอกติวิตีอยู่ตลอดเวลาภายในเซลล์ แสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์และการดีพอลิเมอร์ไรเซชันสาร P(3HB) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นไปพร้อมๆกัน

การศึกษาในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการดีพอลิเมอร์ไรเซชันสาร P(3HB) ยังมีไม่มากนัก Pries และคณะ (1991) ศึกษาเกี่ยวกับการ leak ของยีน *phbI* และ *phbH* ซึ่งเกิดใน *R. eutropha* สายพันธุ์กลายพันธุ์ โดยพบว่าในสายพันธุ์กลายจะมีอัตราการดีพอลิเมอร์ไรเซชันสาร P(3HB) สูงกว่าในสายพันธุ์ปกติ ในความเป็นจริงการดีพอลิเมอร์ไรเซชันสาร P(3HB) มีอัตราสูงสุดอยู่ในช่วง stationary phase หลังจากที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากภายนอกหมดแล้ว โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการดีพอลิเมอร์ไรเซชันสาร P(3HB) จะถูกควบคุมโดยกระบวนการ phosphorylation ผ่านการส่งสัญญาณ จาก phosphoenolpyruvate phosphotransferase

system (PEP-PTS) อย่างไรก็ตาม การศึกษาดังกล่าวยังเป็นเพียงสมมติฐาน และยังคงมีการศึกษาวิจัยต่อไป

2.3.8 การนำ P(3HB) ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์

2.3.8.1 ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม

- วัสดุในงานด้านศัลยกรรม เช่น ใช้ทำหลอดเลือดเทียม เข็มเย็บแผล ผ้าซับเลือดและผ้าสमानแผล เป็นต้น

- วัสดุเพื่อการบำบัดและการรักษาโรค ได้แก่ แคปซูลบรรจุยา หรือวัคซีนที่ต้องการให้ตัวยาค่อยๆถูกปล่อยออกมาในปริมาณน้อยๆเป็นเวลานาน หรือใช้ทำกระดูกเทียมโดยอาศัยสมบัติการเป็น piezoelectric ของ P(3HB) ซึ่งคล้ายกับสมบัติที่มีในกระดูกธรรมชาติ จึงใช้เป็นแผ่นยึดกระดูกซึ่งจะมีผลต่อการสร้างกระดูกขึ้นมาทดแทน

- ด้านทันตกรรมได้นำ P(3HB) มาใช้เป็นวัสดุตัวนำที่ทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาใหม่ในโรคปริทันต์ (periodontitis)

- ใช้ P(3HB) เป็นสารตั้งต้นในการผลิต R(-)-3-hydroxybutyric acids ซึ่งสารนี้สามารถใช้เป็น chiral building blocks สำหรับสังเคราะห์สารเคมีบริสุทธิ์ เช่น ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) วิตามิน (vitamin) และฟีโรโมน (pheromone)

2.3.8.2 ด้านเกษตรกรรมและปศุสัตว์

- ใช้เป็นแคปซูลสำหรับบรรจุยา รักษาโรคและวัคซีนต่างๆในสัตว์เลี้ยง เช่น วัคซีนป้องกันโรคระบาด ยาถ่ายพยาธิ เป็นต้น และบรรจุยาประเภทที่มีกลไกการออกฤทธิ์นาน ช่วยให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการกระตุ้นซ้ำ

- ใช้เป็นแคปซูลบรรจุปุ๋ย ฮอริโมน growth factors ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช ซึ่งแคปซูลจะค่อยๆสลายตัวที่ละน้อยโดยจุลินทรีย์ในดิน สารที่บรรจุข้างในจึงถูกปล่อยออกมาทำให้สารดังกล่าวอยู่ในดินหรือตำแหน่งที่ต้องการใช้งานได้เป็นเวลานาน จึงประหยัดเวลา แรงงาน และลดต้นทุนการผลิต นอกจากนี้ยังใช้เป็นพลาสติกคลุมดิน รักษาความชื้น ซึ่งเมื่อหมดเวลาการใช้งานจะค่อยๆถูกสลายไปโดยธรรมชาติ

2.3.8.3 บรรจุภัณฑ์หรือส่วนประกอบของอุปกรณ์บางประเภท

- ใช้ผลิตขวดแชมพู
- ใช้ทำบรรจุภัณฑ์ประเภทภาชนะบรรจุอาหารสำเร็จรูป แผ่นฟิล์มถนอมอาหาร
- ใช้ทำวัสดุที่ใช้ครั้งเดียวทิ้ง เช่น ผ้าอ้อม ผ้าอนามัย ด้ามมีดโกน เป็นต้น
- ใช้ทำวัสดุอื่นๆ เช่น ที่วางลูกกอล์ฟ กาวที่ละลายด้วยความร้อน สารเคลือบผิว แผ่นฟิล์ม บัตรเครดิต วัสดุเส้นใย (โดยถ้าผสม P(3HB) ลงในเส้นใยฝ้าย จะช่วยให้สมบัติในการรับความร้อนและคายความร้อนของเส้นใยช้าลง และเพิ่มความแข็งแรงของเส้นใย) เป็นต้น

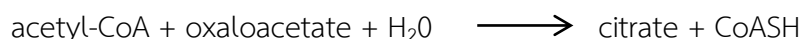
ปัจจุบันกำลังมีการวิจัยและพัฒนาเพื่อใช้เป็นส่วนประกอบของอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และรถยนต์ เช่น หน้ากากโทรศัพท์มือถือ ชิ้นส่วนประกอบภายในรถยนต์ ส่วนของเครื่องเล่นดีวีดี เป็นต้น (สงศรี กุลปรีชา, 2536)

2.4 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในงานวิจัย

2.4.1 ซิเตรท ซินเทส (citrate synthase)

ซิเตรท ซินเทส (E.C. 2.3.3.1) เป็นเอนไซม์ตัวแรกของวิถี TCA หรือ Krebs cycle ซึ่งเป็นวิถีชีวสังเคราะห์ที่สำคัญของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นวิถีหลักในการผลิตพลังงานในรูปของ ATP และสาร reducing power ให้แก่เซลล์เพื่อใช้ในการเจริญ (Weitzman และ Danson, 1976)

ปฏิกิริยาการแคทาบอลิท์ของซิเตรท ซินเทส คือ



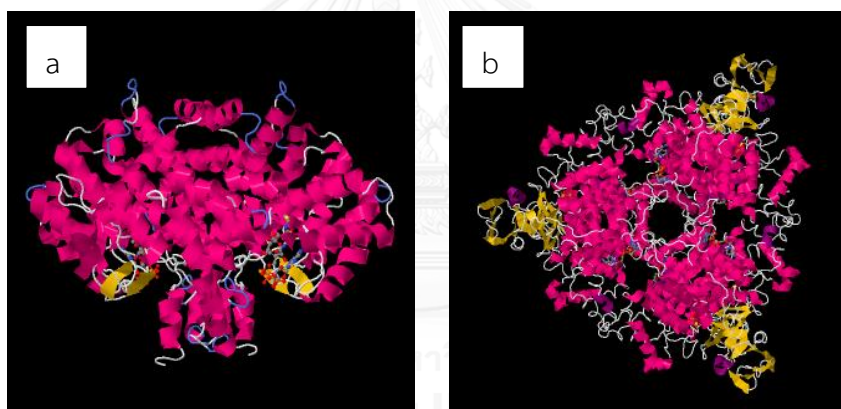
ซิเตรท ซินเทสจะเร่งปฏิกิริยาให้แอกซิทิล-โคเอ 2 โมเลกุล รวมตัวกับออกซาโลแอซิเตต (oxaloacetate) ด้วยปฏิกิริยา aldol condensation ได้เป็นซิเตรท (citrate) และปล่อย CoASH อีสรระออกมา ทั้งนี้ซิเตรท ซินเทสยังมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเผาผลาญพลังงานในสิ่งมีชีวิต (Weitzman, 1981) เนื่องจากวิถี TCA มีหน้าที่สำคัญในการสร้างพลังงานโดยผ่านกระบวนการ oxidative phosphorylation ของจุลินทรีย์กลุ่มที่ต้องการออกซิเจน และยังทำหน้าที่ในการสร้างสารมัธยันตร์ เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ เช่น α -ketoglutaric acid และ succinic acid เป็นต้น ดังนั้นวิถี TCA จึงจัดเป็นวิถีที่เรียกว่า amphibolic pathway ซึ่งทำหน้าที่ทั้งสร้าง

พลังงาน และสังเคราะห์สารตั้งต้นหลายชนิดสำหรับกระบวนการชีวสังเคราะห์ (Nelson และ Cox, 2013) ซิเตรท ซินเทส แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (Daidone และคณะ, 2004) คือ

กลุ่มที่ 1 พบในยูแคริโอต (eukaryotes), แบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียอาร์เคีย (archaea bacteria) มีลักษณะเป็นโฮโมไดเมอร์ (homodimers) ที่สั้นกว่ากลุ่มที่ 2

กลุ่มที่ 2 พบในแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะเป็นเฮกซะเมอร์ริก (hexameric)

โดยทั้งสองกลุ่มประกอบด้วยกรดอะมิโน 437 ตัว โดยถูกจัดให้เป็นระเบียบได้ 2 โดเมน (domains) ซึ่งประกอบไปด้วย 20 alpha-helices บริเวณแอคทีฟไซต์ (active site) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ His274, His320 และ Asp375 จึงทำให้มีความจำเพาะต่อการทำปฏิกิริยาต่อซับสเตรท (substrates) ค่อนข้างสูง (Lehninger และคณะ, 2005) นอกจากนี้ ซิเตรทซินเทสยังเป็นเอนไซม์ที่สามารถสร้างพันธะระหว่างคาร์บอนกับคาร์บอน โดยไม่ต้องอาศัยไอออนโลหะเป็นโคแฟกเตอร์ (metal ion cofactors) (Voet และคณะ, 2008)



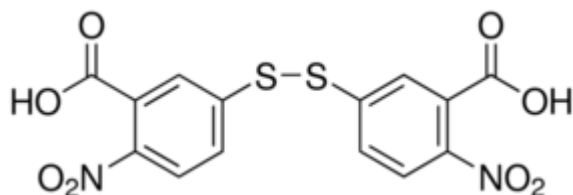
รูปที่ 8 แสดงโครงสร้างของซิเตรท ซินเทส ในยูแคริโอต (a) แบคทีเรีย (b) (Remington และคณะ, 1982)

ตารางที่ 7 ข้อมูลทางจลนศาสตร์ของซีเตรท ซินเทส ในแบคทีเรียชนิดต่างๆ (ปรับปรุงจาก Johnson และ Hanson, 1974)

ข้อมูลทางจลนศาสตร์	<i>B. subtilis</i> HS2A2	<i>A. anitratum</i>	<i>A. vinelandii</i>
K_m acetyl-CoA	0.06 mM	0.10 mM	0.08 mM
K_m oxaloacetate	0.03 mM	0.10 mM	0.02 mM
ATP inhibition patterns;			
varying acetyl-CoA	non-competitive	-	competitive
varying oxaloacetate	non-competitive	-	non-competitive
K_i (ATP) acetyl-CoA varied	1.0 mM	-	0.75 mM
K_i (ATP) oxaloacetate varied	-	-	2.00 mM
Product inhibition patterns;			
1. Citrate	competitive	competitive	competitive
varying acetyl-CoA	non-competitive	non-competitive	non-competitive
varying oxaloacetate			competitive
2. CoASH			
varying acetyl-CoA	competitive	competitive	competitive
varying oxaloacetate	non-competitive	non-competitive	non-competitive

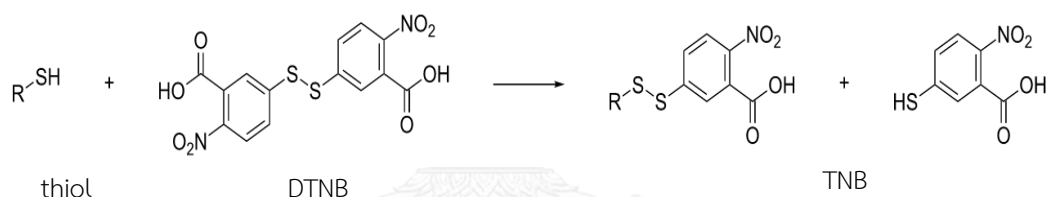
2.4.2 การวิเคราะห์ซีเตรท ซินเทส โดยใช้ Ellman's reagent

Ellman's reagent หรือ 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid หรือ DTNB เป็นสารเคมีที่ใช้วัดความเข้มข้นของหมู่ไทออล (thiol groups) ที่อยู่ในตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ (Ellman, 1959)



รูปที่ 9 โครงสร้างทางเคมีของ DTNB (Riddles และคณะ, 1983)

หมู่ไทออลจะทำปฏิกิริยากับ DTNB โครงสร้างจะถูกแยกที่พันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ได้สาร 2-nitro-5-thiobenzoate (TNB⁻) จากนั้น TNB⁻ จะมีการเพิ่มไอออนในน้ำที่มีค่าความเป็นกรด-เบสเป็นกลางเป็น TNB²⁻ ซึ่งเป็นสารที่ให้สีเหลือง ดังแสดงในรูปที่ 10 และสามารถวัดความเข้มข้นได้โดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร



รูปที่ 10 ปฏิกิริยาของ DTNB กับหมู่ไทออล (Riddles และคณะ, 1983)

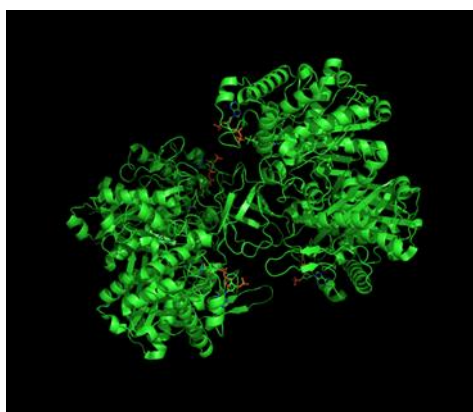
DTNB ใช้สำหรับการวิเคราะห์สารประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น กลูตาไธโอนทั้งที่เป็นสารละลายบริสุทธิ์ หรืออยู่ในตัวอย่างทางชีวภาพ เช่น เลือด นอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์สารประกอบที่มีหมู่ไทออล เช่น อะเซทิล-โคเอ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์ซิติเรท ซินเทสเป็นตัวคะตะไลซ์ เป็นต้น (Riener และคณะ, 2002)

2.4.3 ปีต้า-คีโตไทโอเลส (beta-ketothiolase)

ปีต้า-คีโตไทโอเลส (β -ketothiolase หรือ acetyl-CoA-C-acetyltransferase) (EC 2.3.1.9) เป็นเอนไซม์ตัวแรกของวิถีการสังเคราะห์ P(3HB) โดยเร่งปฏิกิริยารวมตัวของอะเซทิล-โคเอ 2 โมเลกุล ให้เป็นอะเซโตอะเซทิล-โคเอ (Merilainen และคณะ, 2009) ดังสมการ



ปีต้า-คีโตไทโอะเลส เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มของทรานส์เฟอเรส (transferase) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาปีต้า-ออกซิเดชัน (β -oxidation) ของการย่อยสลายกรดไขมัน และวิถีชีวสังเคราะห์อื่นๆ



รูปที่ 11 แสดงโครงสร้างแบบเตตระเมอริกของปีต้า-คีโตไทโอะเลส จาก *Zoogloea ramigera*

ปีต้า-คีโตไทโอะเลส มีโครงสร้างเป็นแบบเตตระเมอริก (tetrameric) โดยจะเกิดปฏิกิริยากับโคเอ โดยบริเวณเอกทีฟไซต์ คือ บริเวณกรดอะมิโน Cys89 จึงทำให้มีความจำเพาะต่อการทำปฏิกิริยาต่อซับสเตรตสูง

ตารางที่ 8 แสดงข้อมูลทางจลนศาสตร์ของปีต้า-คีโตไทโอะเลส (Wiesenborn และคณะ, 1988; Petersen และ Bennett, 1991; Stim-Herndon และคณะ, 1995)

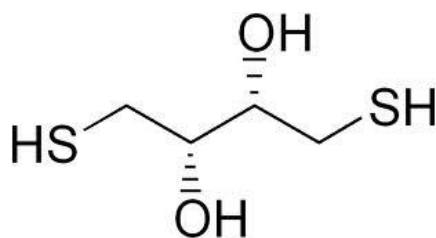
ข้อมูลจลนศาสตร์	ข้อมูล
K_m acetyl-CoA	270.0 μ M
K_m CoA	4.8 μ M
K_m acetoacetyl-CoA	32.0 μ M

product inhibition patterns;

- | | |
|------------------------------------|-------------------|
| 1. CoA | competitive |
| 2. 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoate | unknown Mechanism |
| 3. Iodoacetamide | unknown Mechanism |
| 4. ATP | unknown Mechanism |
| 5. butanoyl-CoA | unknown Mechanism |

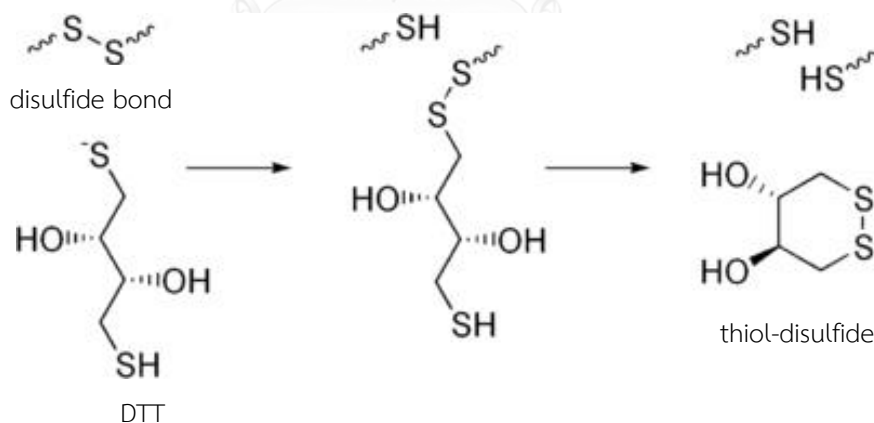
2.4.4 การวิเคราะห์ปิต้า-คีโตโทโอเลส โดยใช้ Cleland's reagent

Cleland's reagent หรือ dithiothreitol (DTT) เป็นสารเคมีที่มีโมเลกุลเล็ก มีสูตรเคมี คือ $C_4H_{10}O_2S_2$ เป็นสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ความเข้มข้นของสารประกอบที่มีพันธะไดซัลไฟด์ เช่น โปรตีน และเอนไซม์ชนิดต่างๆ เป็นต้น หรือสารประกอบที่มีหมู่ไทออล (Cleland, 1964)



รูปที่ 12 โครงสร้างทางเคมีของ DTT

เมื่อ DTT ทำปฏิกิริยากับสารประกอบประเภทโปรตีน DTT จะทำลายพันธะไดซัลไฟด์ในสารประกอบประเภทโปรตีน และ DTT จะเกิดเป็นโครงสร้างแบบวง ซึ่งมีพันธะไดซัลไฟด์อยู่ภายในโครงสร้าง เรียกว่า ไทออล-ไดซัลไฟด์ (thiol-disulfide) (Lukesh และคณะ, 2012) ดังแสดงในรูปที่ 13 และสามารถวัดความเข้มข้นได้โดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 303 นาโนเมตร



รูปที่ 13 ปฏิกิริยารีดักชันของพันธะไดซัลไฟด์ โดย DTT เกิดเป็น ไทออล-ไดซัลไฟด์

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

- 3.1.1 ถังหมัก (fermenter) ขนาด 10 ลิตร ของบริษัท B.E. Marubishi ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.2 เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี (gas chromatography) รุ่น 3400CX ของบริษัท Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.3 เครื่องสำหรับฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ (auto sampler) รุ่น 8200CX ของบริษัท Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.4 แคปพิลลารีคอลัมน์ (capillary column) ชนิด CP-WAX 52 CB เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มม. ความยาว 60 ม. ของบริษัท Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.5 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psychroterm incubator shaker) รุ่น G27 แบบ rotary ของบริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.6 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น A200S ของบริษัท Satorious ประเทศเยอรมนี
- 3.1.7 เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น L2200P ของบริษัท Satorious ประเทศเยอรมนี
- 3.1.8 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KS-3000P ของบริษัท Kubota ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.9 เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge) รุ่น Centrikon T-42K ของบริษัท Kubota ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.10 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (VIS spectrophotometer) รุ่น Novaspec II ของบริษัท Pharmacia Biotech ประเทศอังกฤษ
- 3.1.11 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 2000 ของบริษัท Cyberscan ประเทศสิงคโปร์
- 3.1.12 ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124 ของบริษัท ISSCO ประเทศสหรัฐอเมริกา

- 3.1.13 ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น INE 500 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี
- 3.1.14 ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UL-60 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี
- 3.1.15 ตู้อบแห้ง (dryer oven) รุ่น UL-80 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี
- 3.1.16 หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท Tomy ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.17 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W760 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี
- 3.1.18 ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo Electric ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.19 ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ของบริษัท Forma Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.20 กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CH30RF200 ของบริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.21 ไมโครปิเปต ขนาด 100 200 1,000 5,000 และ 10,000 มิลลิลิตร ของบริษัท Gilson ประเทศฝรั่งเศส
- 3.1.22 กระดาษกรอง Whatmanเบอร์ 1 และ 2 ของบริษัท Whatman ประเทศอังกฤษ
- 3.1.23 หลอดทดลองฝาเกลียว (screw-cap tube) ของบริษัท PYREX ประเทศเยอรมนี
- 3.1.24 เครื่องกลั่นสำหรับวิเคราะห์ไนโตรเจน รุ่น K-350 ของบริษัท BUCHI

3.2 เคมีภัณฑ์

- 3.2.1 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.2 กรดซิตริก ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.3 กรดบอริก (H_3BO_3) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.4 กรดเบนโซอิก ($C_7H_6O_2$) ของบริษัท Nacalaitesque ประเทศญี่ปุ่น
- 3.2.5 กรดอะซิติก ($C_2H_4O_2$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.6 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.7 กลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

- 3.2.8 ซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 2.2.9 คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.10 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) ของบริษัท J.T.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.11 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.12 โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 6H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี
- 3.2.13 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี
- 3.2.14 โซเดียมคลอไรด์ ($NaCl$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.15 โซเดียมไฮดรอกไซด์ ($NaOH$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.16 โซเดียมไฮโปคลอไรด์ ($NaOCl$) ของบริษัท Clorox ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.17 ไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.18 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ของบริษัท Fluka ประเทศเยอรมนี
- 3.2.19 นิกเกิลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.20 โซเดียมโพรพิเนต ($C_3H_5O_2Na$) ของบริษัท Fluka ประเทศเยอรมนี
- 3.2.21 โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa) ของบริษัท Fluka ประเทศเยอรมนี
- 3.2.22 สารมาตรฐานพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [P(3HB)] ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.23 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.24 แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.25 แบคโททริปโทส (Bactotryptose) ของบริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.26 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.27 เฟอรัสซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 5H_2O$) ของบริษัท Unilab ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.28 เมทานอล (CH_3OH) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

- 3.2.29 เอทานอล (C₂H₅OH) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.30 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (Mg₂SO₄·7H₂O) ของบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี
- 3.2.31 แมงกานีสคลอไรด์เฮกซะคลอไรด์ (MnCl₂·6H₂O) ของบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี
- 3.2.32 ยูเรีย (N₂H₆CO) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.33 สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) ของบริษัท Labscan Asia ประเทศไอร์แลนด์
- 3.2.34 สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Springer ประเทศฝรั่งเศส
- 3.2.35 เปปโตน (peptone) ของบริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.36 แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต [(NH₄)₆Mo₇·4H₂O] ของบริษัท J.T.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.37 กากน้ำตาล ของบริษัทมิตรผลวิจัย จำกัด ประเทศไทย
- 3.2.38 วุ้นผง (agar) ของบริษัท บิกเบนโปรดักตอรา เดออะการ์เอส. เอ ประเทศชิลี
- 3.2.39 ก๊าซไฮโดรเจน (H₂) ของบริษัท PRAXAIR ประเทศไทย
- 3.2.40 ก๊าซออกซิเจน (O₂) ของบริษัท TIG (Thai Industrial Gas) ประเทศไทย
- 3.2.41 ก๊าซไนโตรเจน (N₂) ของบริษัท PRAXAIR ประเทศไทย
- 3.2.42 อะซิโตอะซิทิล-โคเอนไซม์เอ (acetoacetyl-coenzyme A ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.43 โคเอนไซม์ เอ (Coenzyme A) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.44 อะซิทิล-โคเอนไซม์เอ (acetyl-CoA) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.45 ออกซาโลอะซิเตท (oxaloacetate) –บริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษา

จุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษาคือ *B. megaterium* BA-019 ซึ่งคัดแยกได้จากดินโดยรัตนศิริ มุขิตากุล (2538) โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ และจัดจำแนกสปีชีส์ด้วยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA โดยกุสุมา กมลจรัสโสภา (2547)



รูปที่ 14 *B. megaterium* BA-019 เมื่อย้อมสีแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า



รูปที่ 15 *B. megaterium* สายพันธุ์ BA-019 เมื่อย้อมสีชูดาน แบลค ปี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.2.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (stock culture medium) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากยีสต์	3.0	กรัม
แบคโททริปโทส	5.0	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (การนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน)

3.3.2.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed culture medium) ใช้สูตรของ Doi และคณะ (1989) ซึ่งศึกษาปรับปรุงโดย สุดา สุภาชวินสวัสดิ์ (2542) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากยีสต์	10.0	กรัม
แบคโททริปโทส	10.0	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
น้ำตาลทราย	10.0	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยแยกสารละลายน้ำตาลนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.3.2.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการสังเคราะห์และสะสมพอลิเมอร์ P(3HB) คือ อาหาร Mineral Salt Medium (MSM) (อดิพล บุญเรืองถาวร, 2543) ใน 1 ลิตรประกอบด้วย

กากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar)	60.0	กรัม
ยูเรีย	6.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6	กรัม

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัม
โซเดียมอะซีเตต	2.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.1	กรัม
กรดบิวทริก	0.8	มิลลิลิตร
สารละลาย trace element	1.0	มิลลิลิตร

แยกละลายเกลือแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตและสารละลาย trace element เมื่อละลายแล้วจึงนำมารวมกัน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ส่วนของสารละลายน้ำตาลแยกนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

สารละลาย trace element ใน 1 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริก 1 ลิตร ประกอบด้วย

แคลเซียมคลอไรด์	20.0	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	1.30	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.20	กรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต	0.60	กรัม
กรดบอริก	0.60	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เฮกซะคลอไรด์	0.08	กรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	0.50	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต	0.05	กรัม
นิกเกิลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	0.02	กรัม

3.3.2.4 การเตรียมกากน้ำตาลสำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

3.3.2.4.1 เจือจางกากน้ำตาลด้วยน้ำประปาต้มในอัตราส่วน 1 ต่อ 1

3.3.2.4.2 นำกากน้ำตาลที่เจือจางแล้วมาปั่นแยกตะกอนออกที่ความเร็วรอบ 20,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่อง tubular bowl centrifuge

3.3.2.4.3 นำกากน้ำตาลที่ผ่านการปั่นแยกตะกอนแล้วมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid (DuBois และคณะ, 1956) และเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม

3.3.3 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

3.3.3.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะสั้น

เชื้อจุลินทรีย์โดยใช้รูปเชื้อแข็ง (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาเชื้อแข็งโดยขีดลงบนอาหารใหม่ทุก 1 เดือน

3.3.3.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะยาว

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อจากข้อ 3.3.2.2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ที่ความเร็ว 9820 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% น้ำหนักต่อปริมาตร ปั่นแยกเซลล์และทำซ้ำอีกครั้ง กระจายเซลล์ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% ปริมาตรต่อปริมาตร ที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และปรับค่าดูดกลืนแสงให้อยู่ในช่วง 0.8-1.0 (จำนวน 109 CFU/ml) และบรรจุลงในหลอดเยือกแข็ง (cryotube) ที่ปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน หรือเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี

3.3.4 การเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสังเคราะห์ P(3HB)

3.3.4.1 เตรียมกล้าเชื้อโดยเชื้อ *B. megaterium* BA-019 โดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอียง จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลง สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % น้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อให้ได้เป็นเซลล์แขวนลอย (cell suspension) และปรับความเข้มข้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อในข้อ 3.3.2.2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (4% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

3.3.4.2 นำกล้าเชื้อในข้อ 3.3.4.1 ปริมาตร 600 มิลลิลิตร (คิดเป็น 10% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ใส่ลงในถังหมักขนาด 10 ลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการสังเคราะห์และการสะสม P(3HB) ได้แก่อาหาร MSM ในข้อ 3.3.2.3 เมื่อใช้น้ำตาลทรายที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยปริมาตรสุทธิของอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักเท่ากับ 6 ลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.4.3 เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ P(3HB) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ

3.3.4.4 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ P(3HB) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับน้ำตาลทรายคือ 60 กรัมต่อลิตร

3.3.5 การเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เพื่อศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการเจริญและการสังเคราะห์ P(3HB) โดยการตรวจติดตามแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส และปีต้า-คีโตไทโอเลส

3.3.5.1 เตรียมกล้าเชื้อ โดยเชื้อเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอียง จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % น้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อให้ได้เป็นเซลล์แขวนลอย (cell suspension) และปรับความเข้มข้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อในข้อ 3.3.2.2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (4% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

3.3.5.2 นำกล้าเชื้อในข้อ 3.3.5.1 ปริมาตร 600 มิลลิลิตร (คิดเป็น 10% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) เพาะลงในถังหมักขนาด 10 ลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการสังเคราะห์และการสะสม P(3HB) ได้แก่อาหาร MSM ในข้อ 3.3.2.3 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.3.4 โดยปริมาตรสุทธิของอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักเท่ากับ 6 ลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.5.3 แปรปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20 40 60 และ 80% ความอิมิตัวของออกซิเจน

3.3.5.4 เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หา น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และแอคติวิตีของปีต้า-คีโตไทโอเลส และซิเตรท ซินเทส

3.3.6 การเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดซิตริกที่มีต่อการเจริญ และการสังเคราะห์ P(3HB) โดยการตรวจติดตามแอกติวิตีของซิเตรท ซินเทส และปีต้า-คีโตไทโอเลส

3.3.6.1 เตรียมกล้าเชื้อ โดยเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอียง จากนั้นปั่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % น้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อให้ได้เป็นเซลล์แขวนลอย (cell suspension) และปรับความเข้มข้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อในข้อ 3.3.2.2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (4% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

3.3.6.2 นำกล้าเชื้อในข้อ 3.3.6.1 ปริมาตร 600 มิลลิลิตร (คิดเป็น 10% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) เพาะลงในถังหมักขนาด 10 ลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการสังเคราะห์และการสะสม P(3HB) ได้แก่อาหาร MSM ในข้อ 3.3.2.3 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.3.4 และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในข้อ 3.3.5 โดยปริมาตรสุทธิของน้ำหมักเท่ากับ 6 ลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.6.3 แปรการเติมปริมาณกรดซิตริกเท่ากับ 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร ในอาหาร MSM ในข้อ 3.3.2.3

3.3.6.4 เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์แห้ง ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และแอกติวิตีของปีต้า-คีโตไทโอเลส และซิเตรทซินเทส

3.4 วิธีวิเคราะห์

3.4.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำหมักปริมาตร 50 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 9,820 g เป็นเวลา 15 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ใส่ในถ้วยอลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว อบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักถ้วยอลูมิเนียมที่มีเซลล์อบแห้งจนน้ำหนักคงที่ คำนวณปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์แล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid (DuBois และคณะ, 1956) โดยเติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5% น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่าง น้ำตาลซูโครสและค่าดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1) คำนวณปริมาณ น้ำตาลทั้งหมดในน้ำหมัก (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.4.3 การวิเคราะห์สัดส่วนของมอนอเมอร์และปริมาณของพอลิเมอร์โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography; GC)

โดยวิธีของ Comeau และคณะ (1988) โดยการปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ ความเร็ว 9,820 g เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์ไปอบแห้งประมาณ 10-12 ชั่วโมง แล้วชั่งเซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัม ใส่หลอดฝาเกลียว เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร จากนั้น เติมเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 3 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (มีกรดเบนโซอิก เป็นสารละลายมาตรฐานภายใน ความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วเขย่าอย่างแรงนาน 5 นาที จากนั้น นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,380 g เป็นเวลา 10 นาที เก็บชั้นคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) ซึ่งมีอนุพันธ์ของเมทิล เอสเทอร์ของมอนอเมอร์ แล้วนำไปวิเคราะห์สัดส่วนของมอนอเมอร์และปริมาณพอลิเมอร์โดยวิธีก๊าซ โครมาโตกราฟีภายใต้ภาวะ ดังนี้

ชนิดของคอลัมน์	: แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด CP wax – 52 CB
เส้นผ่านศูนย์กลาง	0.25 มิลลิเมตร ความยาว 60 เมตร
อุณหภูมิของ injector	: 250 องศาเซลเซียส (isothermal)
อุณหภูมิของคอลัมน์	: 130 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที
รักษาอุณหภูมิไว้ที่	180 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ Detector (FID)	: 250 องศาเซลเซียส (isothermal)
Split ratio	: 50 ต่อ 1

ก๊าซตัวพา (carrier gas) : ก๊าซไนโตรเจนอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

ปริมาตรที่ฉีด : 1 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์ชนิดของมอนอเมอร์โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ P(3HB) และพื้นที่ใต้กราฟของ P(3HB) ต่อกรดเบนโซอิก (ภาคผนวก ค หมายเลข 2) คำนวณปริมาณ P(3HB) (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.4.4 การตรวจติดตามซิเตรท ซินเทส และปีต้า-คีโตไทโอเลส

3.4.4.1 การทำให้เซลล์แตก

ใช้วิธีของ Hao และคณะ (2012) โดยปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ความเร็ว 9,820 g เป็นเวลา 20 นาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอริก พีเอช 7.4 ทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีอัลตราโซนิเคชัน (ultrasonication) ที่ 20 กิโลเฮิร์ต อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที โดยซังเซลล์ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้ว 200 มิลลิกรัมต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตรจากนั้นปั่นแยกเซลล์ออกจากสารละลายบัฟเฟอร์ที่ความเร็วที่ความเร็ว 9,820 g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนในมาวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์ต่อไป

3.4.4.2 การวิเคราะห์แอกติวิตีของปีต้า-คีโตไทโอเลส

ใช้วิธีของ Volova และคณะ (2004) โดยนำสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอริก พีเอช 7.9 (โดยมี แมกนีเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลต่อลิตร และ ไดไฮโอเอียทอล (DTT) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลต่อลิตร) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโคเอ ความเข้มข้น 3.5 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และอะซิโตะซิทิล-โคเอ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นใส่สารละลายส่วนในที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกปริมาณ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำสารละลายที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 303 นาโนเมตร นำมาคำนวณหาแอกติวิตีของปีต้า-คีโตไทโอเลส (ภาคผนวก ข หมายเลข 5)

3.4.4.2 การวิเคราะห์แอกติวิตีของซิเตรท ซินเทส

ใช้วิธีของ Bond และคณะ (2005) นำสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลต่อลิตร พีเอช 8.0 ผสมกับอะซิทิล-โคเอ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และ 0.2 มิลลิโมลต่อลิตรของออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นใส่ กรดไดไฮโอปิส-2-ไนโตรเบนโซอิก (DTNB) ความเข้มข้น 2 มิลลิ

โมลต่อลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และใส่สารละลายส่วนใสที่ได้จากการทำให้เซลล์
แตก ปริมาตร 200 ไมโครลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 412 นาโนเมตร นำมาคำนวณหาแอกติวิตีของ
ซีเตรท ซินเทส (ภาคผนวก ข หมายเลข 5)



บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสังเคราะห์ P(3HB)

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มผลผลิต P(3HB) ด้วยการควบคุมวิถีชีวสังเคราะห์ใน *B. megaterium* BA-019 โดยการตรวจติดตามเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์และการสังเคราะห์ P(3HB) การใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนอาจจะมีผลต่อการวิเคราะห์เอนไซม์ เช่น สีของสารละลายที่จะวิเคราะห์ ความหนืดของกากน้ำตาลอาจมีผลต่อการแตกเซลล์ที่จะใช้วิเคราะห์เอนไซม์ เป็นต้น ในขั้นตอนนี้ของงานวิจัยจึงศึกษาและเปรียบเทียบชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีองค์ประกอบใกล้เคียงกับกากน้ำตาล นั่นคือ น้ำตาลทราย ซึ่งมีองค์ประกอบหลักคือน้ำตาลซูโครส ซึ่งมีความบริสุทธิ์มากกว่ากากน้ำตาล และมีราคาถูก

งานวิจัยในขั้นตอนนี้จึงเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต P(3HB) ตามวิธีในข้อ 3.3.4 เมื่อใช้น้ำตาลทรายที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 60 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 9 และรูปที่ 16) พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 15 เท่ากับ 1.71 ± 0.04 และ 0.24 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และได้ P(3HB) เท่ากับ $14.97 \pm 0.43\%$ (โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง) จากนั้นจึงศึกษาต่อโดยเปรียบเทียบการเจริญและการผลิต P(3HB) ของ *B. megaterium* BA-019 โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญ การผลิต P(3HB) และการวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์และการสังเคราะห์ P(3HB) ดังแสดงผลในตารางที่ 10 และรูปที่ 17 พบว่า เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อได้น้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 20.87 ± 0.06 และ 5.82 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และได้ P(3HB) เท่ากับ $27.88 \pm 0.17\%$ (โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง)

เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) ปริมาณ P(3HB) และการเจริญจำเพาะ ในภาวะที่ใช้แหล่งคาร์บอนต่างกันได้แก่ น้ำตาลทราย และกากน้ำตาล (ตารางที่ 11) พบว่าการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนมีผลทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของ P(3HB) สูง

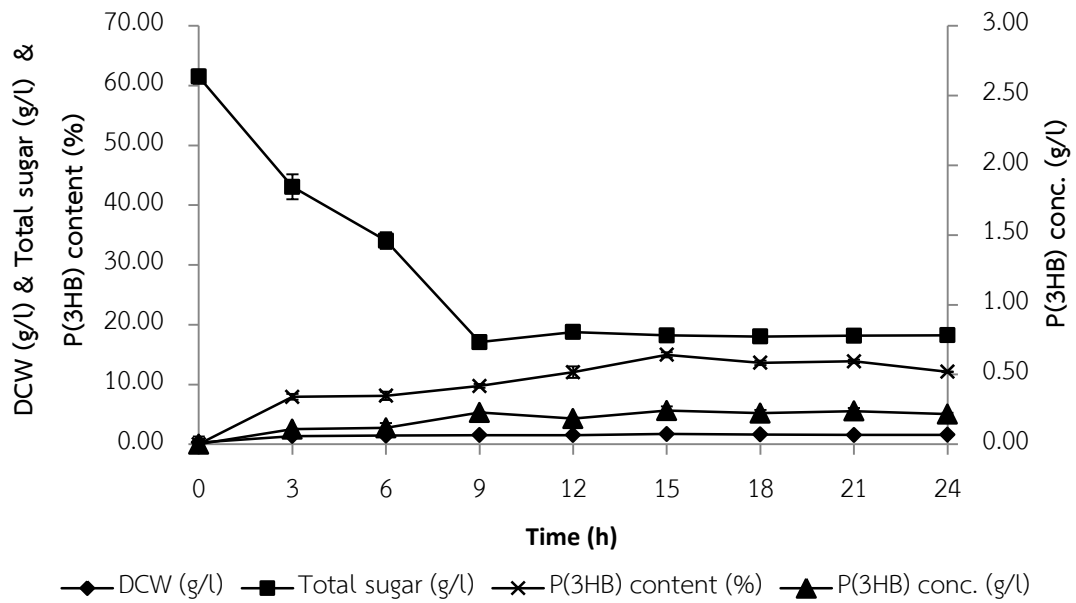
กว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนประมาณ 20 เท่า เมื่อพิจารณาค่า อัตราการผลิต P(3HB) ในภาวะที่ใช้ น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน ได้เพียง 0.02 ± 0.01 กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง ซึ่งต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ในภาวะที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งได้เท่ากับ 0.39 ± 0.04 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมากกว่าประมาณ 20 เท่าเช่นเดียวกัน

การศึกษาวิจัยต่อไป สำหรับการผลิต P(3HB) จึงใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ ดังนี้ อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.41 ± 0.02 ต่อชั่วโมงที่ชั่วโมงที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อ ผลผลิตผลิตภัณฑ์ต่อสับเซตรท ($Y_{P/S}$) เท่ากับ 0.10 ± 0.01 กรัม P(3HB) ต่อกรัม น้ำตาล และผลผลิตเซลล์ต่อสับเซตรท ($Y_{X/S}$) เท่ากับ 0.35 ± 0.03 กรัมเซลล์ต่อกรัม น้ำตาล ทั้งนี้ได้พบว่าการใช้กากน้ำตาลไม่มีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์เอนไซม์ซึ่งจะศึกษาในงานวิจัยขั้นตอนต่อไป โดยเป็นการศึกษาเอนไซม์สองชนิดที่คะตะไลซ์ปฏิกิริยาการเจริญและการสังเคราะห์ P(3HB) เอนไซม์ทั้งสองชนิดคือ บีต้า-คีโตไทโอเลส และ ซิเตรท ซินเทส ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดที่อยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย ดังนั้นก่อนการวิเคราะห์จึงต้องปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากส่วนใส (supernatant) และนำมาทำให้เซลล์แตกก่อนนำมาวิเคราะห์ แอคติวิตีของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว

ตารางที่ 9 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลทรายที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร

Time (h)	DCW (g/l)	total sugar (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.29±0.05	61.51±1.18	0.00±0.00	0.00±0.00
3	1.37±0.06	43.08±2.09	0.11±0.00	7.92±0.48
6	1.44±0.07	34.06±1.39	0.12±0.04	8.11±0.69
9	1.53±0.06	17.08±0.73	0.23±0.00	9.76±0.32
12	1.52±0.00	18.78±0.14	0.18±0.01	12.05±0.97
15	1.71±0.04	18.21±0.17	0.24±0.03	14.97±0.43
18	1.63±0.02	18.01±0.38	0.22±0.02	13.64±0.37
21	1.55±0.05	18.16±0.24	0.24±0.02	13.86±0.28
24	1.58±0.06	18.24±0.14	0.22±0.01	12.13±0.07

หมายเหตุ: ±SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

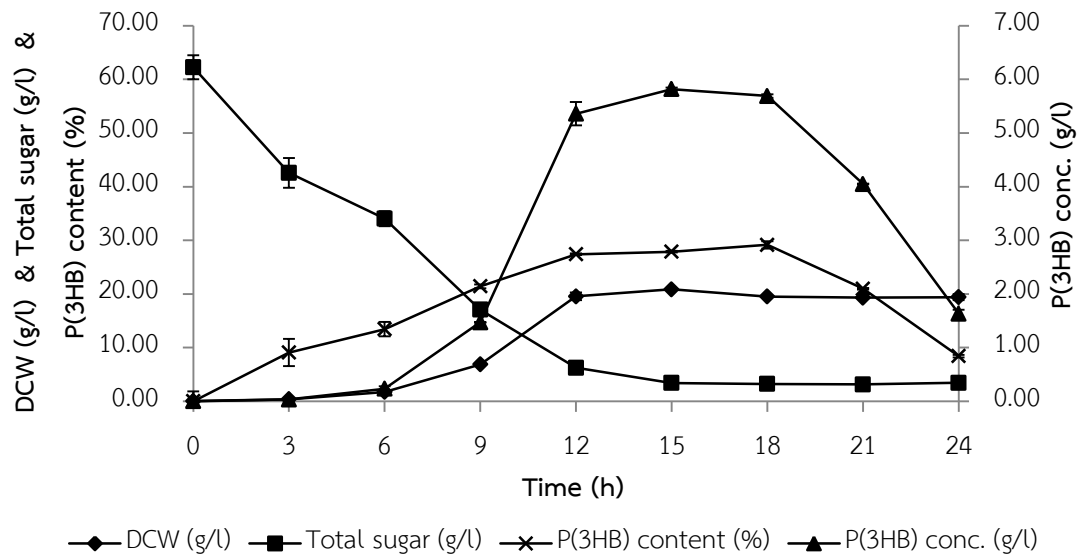


รูปที่ 16 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลทรายที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 10 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร

Time (h)	DCW (g/l)	total sugar (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt)
0	0.04±0.05	61.25±1.23	0.00±0.00	0.00±0.00
3	0.36±0.00	42.58±2.79	0.03±0.01	9.09±0.52
6	1.75±0.06	34.06±1.39	0.23±0.05	13.43±1.34
9	6.87±0.00	17.08±0.73	1.47±0.00	21.42±0.36
12	19.56±0.71	6.26±0.14	5.36±0.22	27.40±0.16
15	20.87±0.06	3.43±0.17	5.82±0.03	27.88±0.17
18	19.52±0.04	3.23±0.38	5.69±0.03	29.15±0.69
21	19.31±0.13	3.13±0.10	4.05±0.01	20.98±0.16
24	19.40±0.57	3.45±0.14	1.63±0.07	8.41±0.26

หมายเหตุ: ±SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ



รูปที่ 17 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) ปริมาณ P(3HB) อัตราผลผลิต P(3HB) และค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ที่สำคัญ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลทรายและในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากน้ำตาลซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร

parameters	carbon source	
	granulated sugar	molasses
cultivation time (h)	15	15
DCW (g/L)	1.71±0.04	20.87±0.06
P(3HB) concentration (g/L)	0.24±0.03	5.82±0.03
P(3HB) content (% by wt.)	14.97±0.43	27.88±0.17
P(3HB) productivity (g/L-h)	0.02±0.01	0.39±0.04
μ (h ⁻¹)	0.18±0.01	0.41±0.02
$Y_{P/S}$	0.01±0.00	0.10±0.01
$Y_{X/S}$	0.03±0.00	0.35±0.03

*รายงานที่ชั่วโมงที่มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด

จากผลการศึกษาพบว่ากากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำให้ *B. megaterium* BA-019 เจริญและผลิต P(3HB) ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับน้ำตาลทราย โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุดคือ 20.87±0.06 และ 5.82±0.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าเมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากันประมาณ 20 เท่า อาจเนื่องมาจากในกากน้ำตาลประกอบไปด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์อยู่หลายชนิด เช่น น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรักโตส รวมทั้งวิตามินและแร่ธาตุอาหารสำคัญจำนวนมาก ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 องค์ประกอบของกากน้ำตาล (Wright และคณะ, 2014)

Component	Average values
moisture, g/100 g	38.7
energy, kJ/100 g	942
protein (N x 6.25, g/100 g)	2.1
fat, g/100 g	0.9
sucrose, g/100 g	29.0
glucose, g/100 g	5.4
fructose, g/100 g	6.0
total sugars, g/100 g	41.0
total carbohydrate, g/100 g	53.0
ash, g/100 g	6.1
organic acids, mg/100 g	110
sodium, mg/100 g	47
calcium, mg/100 g	535
iron, mg/100 g	7.3
magnesium, mg/100 g	218
manganese, mg/100 g	4.4
potassium, mg/100 g	2,350
zinc, mg/100 g	0.34

ตารางที่ 12 แสดงให้เห็นว่าในกากน้ำตาลมีองค์ประกอบของสารอาหารอยู่หลายชนิด จุลินทรีย์สามารถเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่สามารถใช้ได้ง่าย เช่น น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรักโทส และระหว่างการเจริญ จุลินทรีย์จึงปล่อยเอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) เพื่อย่อยน้ำตาลซูโครสเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อไปได้อีกด้วย (Keevil และคณะ, 1984) นอกจากนี้กากน้ำตาลยังมีวิตามิน และแร่ธาตุที่ใช้ในการเจริญ แร่ธาตุบางชนิดยังเป็นโคแฟกเตอร์ที่สำคัญของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ แต่น้ำตาลทรายซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาลซูโครสเพียงชนิดเดียว ไม่มีสารอาหาร และแร่ธาตุอื่นๆเหมือนในกากน้ำตาล จึงทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ไม่ดีเท่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

เนื่องจากกากน้ำตาลเป็นของเสียเหลือใช้จากการผลิตน้ำตาลทราย จึงมีการศึกษาการนำกากน้ำตาลมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆจากจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณมาก หาได้ง่าย และราคาถูก

Ren และคณะ (2006) พบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen) โดยจุลินทรีย์ในน้ำเสีย ทำให้มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 5.57 ลูกบาศก์เมตรของไฮโดรเจนต่อลูกบาศก์เมตรของถังหมักต่อวัน เมื่อทำการผลิตในถังหมักชนิด continuous flow anaerobic fermentation

Bouallagui และคณะ (2013) พบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตไบโอเอทานอล (bioethanol) โดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* ทำให้มีการผลิตเอทานอลได้ 46.5 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 19.2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อทำการผลิตเอทานอลจากถังหมักชนิด membrane reactor (MBR)

4.2 การเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เพื่อศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการเจริญและการผลิต P(3HB) โดยการตรวจติดตามแอกติวิตีของซีเทรท ซินเทส และบีต้า-คีโตไทโอเลส

Dalton และ Postgate (1968) พบว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารมีผลต่อการเจริญและกระบวนการสังเคราะห์สารชนิดต่างๆของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการอากาศในการเจริญ ซึ่ง *B. megaterium* BA-019 เป็นจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการอากาศในการเจริญ ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสม จึงจำเป็นที่จะต้องควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์และปริมาณของ P(3HB) ที่สูง ซึ่งจะส่งผลต่อต้นทุนการผลิต

จากผลการวิจัยที่ได้รายงานในข้อที่ 4.1 งานวิจัยในขั้นตอนนี้จึงเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 60 กรัมต่อลิตร และแปรปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20 40 60 และ 80% ความอิมัตว์ของออกซิเจน ตามวิธีในข้อ 3.3.5 พบว่าทั้ง 4 ภาวะมีรูปแบบการเจริญของ *B. megaterium* BA-019 ที่คล้ายกัน ดังแสดงในตารางที่ 13 15 17 และ 19 และรูปที่ 18 20 22 และ 24 กล่าวคือ การเจริญของ *B. megaterium* BA-019 มีระยะ lag phase ที่ 0-3 ชั่วโมง ระยะ log phase ที่ 6-12 ชั่วโมง และหลังจาก 12 ชั่วโมงไปแล้วจะเข้าสู่ระยะ stationary phase โดยมีปริมาณเซลล์ที่แตกต่างกันไป เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ P(3HB) (ตารางที่ 21 และรูปที่ 26) พบว่าภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20% ของค่าความอิมัตว์ของ

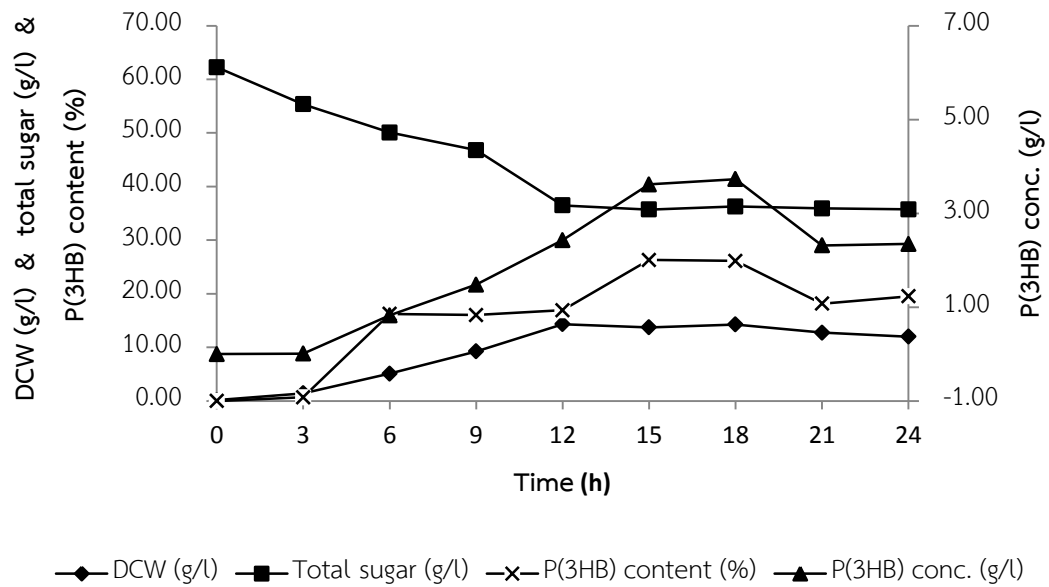
ออกซิเจน (ตารางที่ 13 และรูปที่ 18) เป็นภาวะที่เซลล์มีการเจริญน้อยที่สุดได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 14.35 ± 0.16 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยมีการใช้กากน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงครึ่งหนึ่งของปริมาณทั้งหมด (60 กรัมต่อลิตร) และมีการผลิต P(3HB) สูงสุด คือ 3.73 ± 0.02 กรัมต่อลิตร ส่วนภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ ภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 60% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน (ตารางที่ 17 และรูปที่ 22) โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 15 เท่ากับ 24.39 ± 0.06 กรัมต่อลิตร และมีการผลิต P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 6.80 ± 0.02 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาแอกติวิตีของซิเตรท ซินเทส และบีต้า-คีโตไทโอเลส (ตารางที่ 14 16 18 และ 20 และรูปที่ 19 21 23 และ 25) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญต่อการเจริญและผลิต P(3HB) พบว่าแอกติวิตีของซิเตรท ซินเทสมีความสอดคล้องกับรูปแบบการเจริญของเซลล์ กล่าวคือ เมื่อเซลล์มีการเจริญเพิ่มสูงขึ้น แอกติวิตีของซิเตรท ซินเทสเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน แต่บีต้า-คีโตไทโอเลสมิแอกติวิตีเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 3 และแอกติวิตีจะลดลงในเวลาต่อมา และเมื่อเปรียบเทียบแอกติวิตีของซิเตรท ซินเทสและบีต้า-คีโตไทโอเลสใน 4 ภาวะ ดังแสดงในตารางที่ 22 และ 23 และรูปที่ 27 และ 28 พบว่า ภาวะที่ส่งผลให้แอกติวิตีของเอนไซม์ทั้งสองดังกล่าวสูงที่สุด คือ ภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 60% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน (ตารางที่ 18 และรูปที่ 23) โดยซิเตรท ซินเทสมีแอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 0.6007 ± 0.0042 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และแอกติวิตีสูงสุดของบีต้า-คีโตไทโอเลสเท่ากับ 0.0178 ± 0.0013 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

ตารางที่ 13 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 20% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.16±0.05	61.25±2.23	0.00±0.00	0.00±0.00
3	1.44±0.02	55.35±2.79	0.01±0.00	0.68±0.23
6	5.10±0.27	50.08±1.39	0.83±0.03	16.23±0.19
9	9.25±0.08	46.80±0.73	1.48±0.02	16.04±0.21
12	14.35±0.16	36.50±0.14	2.43±0.18	16.94±0.26
15	13.75±0.24	35.71±0.17	3.62±0.02	26.32±0.58
18	14.28±0.13	36.28±0.38	3.73±0.02	26.13±0.85
21	12.75±0.47	35.93±0.10	2.32±0.05	18.17±0.77
24	12.01±0.24	35.73±0.14	2.35±0.10	19.54±0.65

หมายเหตุ: ±SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

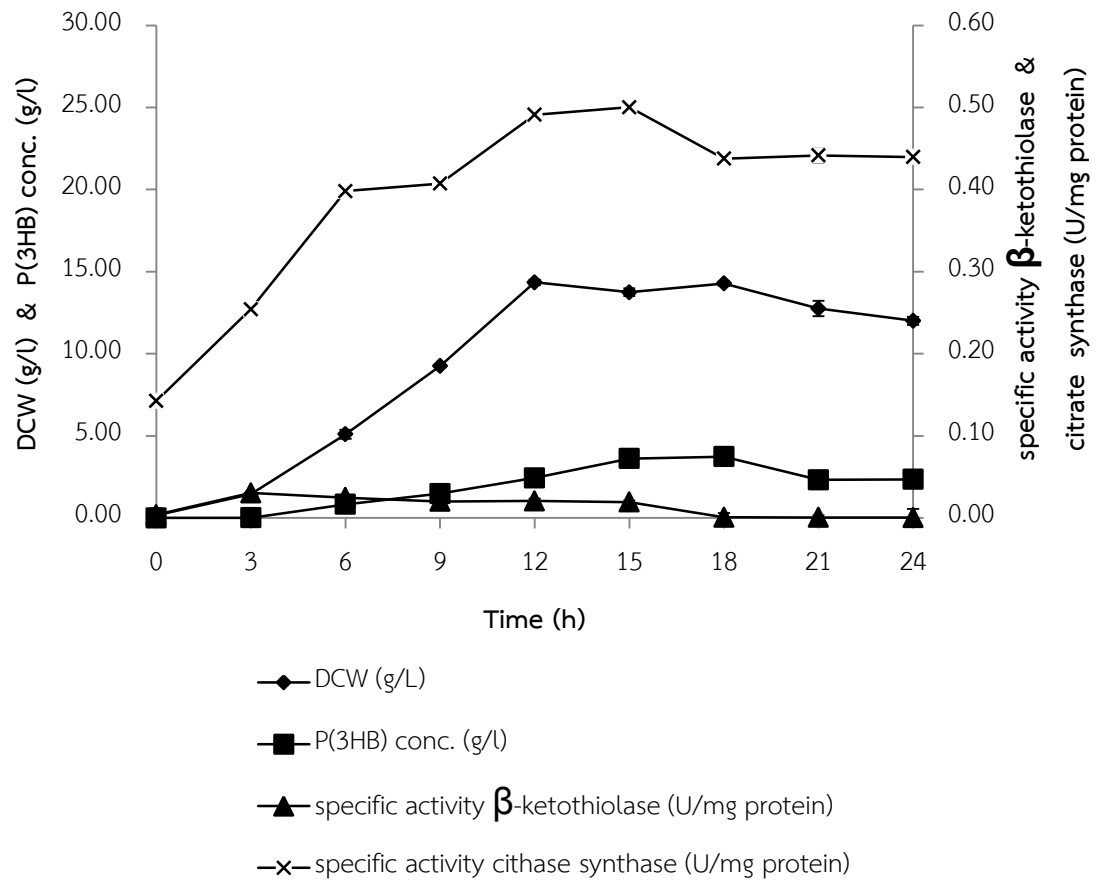


รูปที่ 18 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 20% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน

ตารางที่ 14 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส แอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 20% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน

Time (h)	DCW (g/L)	P(3HB) conc. (g/L)	specific activity β -ketothiolase (U/mg protein)	specific activity citrate synthase (U/mg protein)
0	0.16±0.05	0.00±0.00	0.0038±0.0008	0.1425±0.0044
3	1.44±0.02	0.01±0.00	0.0304±0.0018	0.2541±0.0028
6	5.10±0.27	0.83±0.03	0.0246±0.0031	0.3981±0.0014
9	9.25±0.08	1.48±0.02	0.0201±0.0044	0.4072±0.0059
12	14.35±0.16	2.43±0.18	0.0207±0.0028	0.4911±0.0018
15	13.75±0.24	3.62±0.02	0.0193±0.0016	0.5003±0.0032
18	14.28±0.13	3.73±0.02	0.0008±0.0000	0.4377±0.0013
21	12.75±0.47	2.32±0.05	0.0004±0.0000	0.4417±0.0089
24	12.01±0.24	2.35±0.10	0.0004±0.0000	0.4397±0.0078

หมายเหตุ: \pm SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

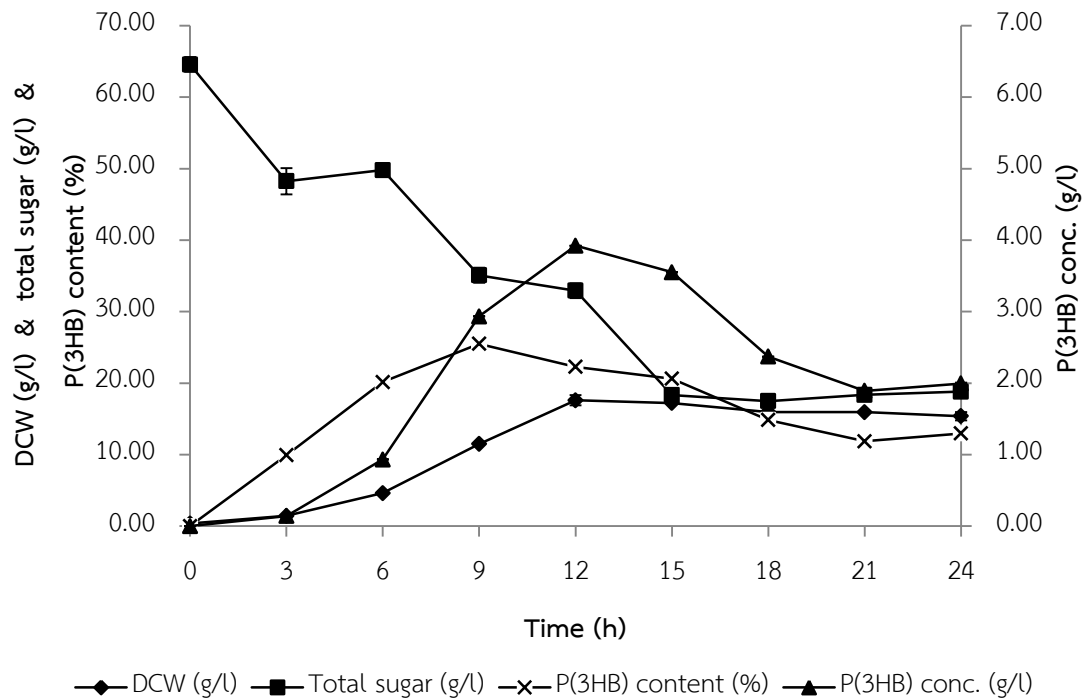


รูปที่ 19 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 20% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน

ตารางที่ 15 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 40% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.36±0.05	63.07±1.05	0.00±0.00	0.00±0.00
3	1.43±0.00	48.25±1.83	0.14±0.00	9.93±0.00
6	4.63±0.06	49.78±0.70	0.93±0.00	20.16±0.00
9	11.50±0.00	35.09±1.05	2.93±0.00	25.51±0.01
12	17.61±0.71	32.92±1.01	3.92±0.03	22.28±0.00
15	17.21±0.06	18.34±0.05	3.55±0.00	20.62±0.00
18	15.96±0.04	17.50±0.35	2.37±0.01	14.85±0.00
21	15.94±0.13	18.36±0.17	1.89±0.00	11.88±0.01
24	15.38±0.57	18.80±0.31	2.00±0.01	12.97±0.01

หมายเหตุ: ±SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

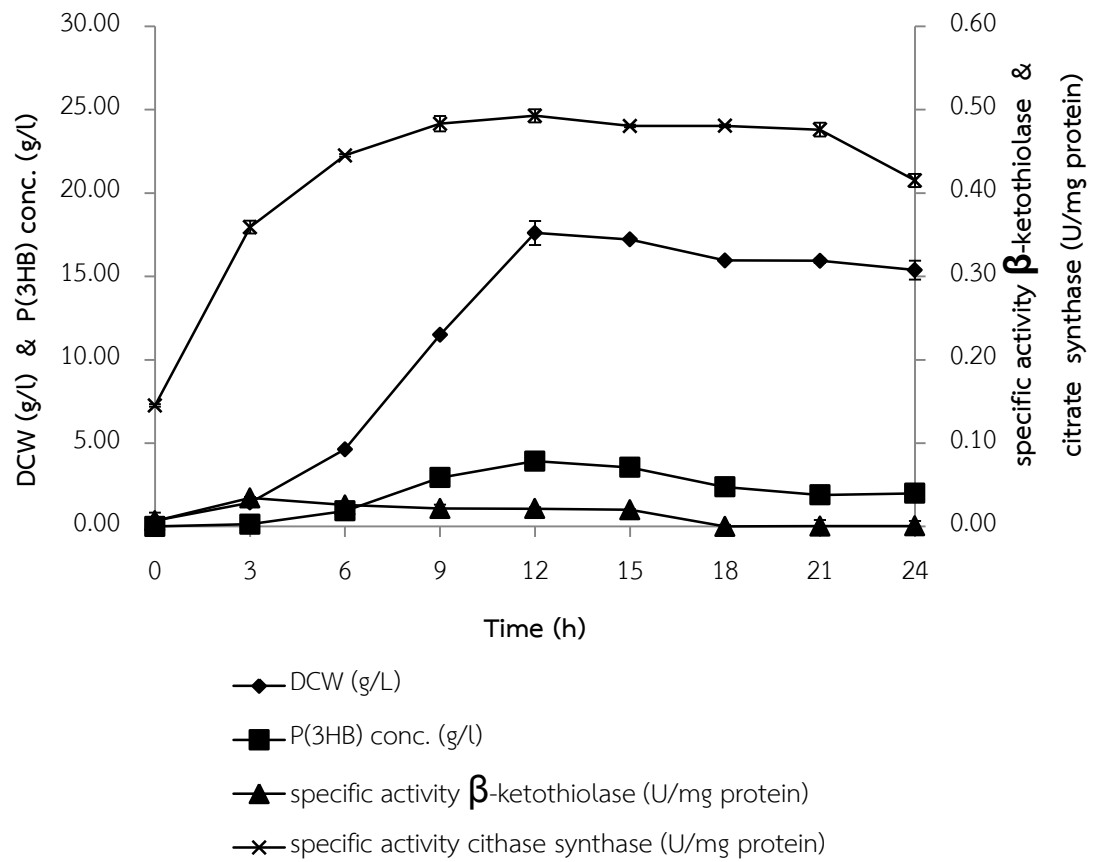


รูปที่ 20 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 40% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน

ตารางที่ 16 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส แอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 40% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน

Time (h)	DCW (g/L)	P(3HB) conc. (g/L)	specific activity β -ketothiolase (U/mg protein)	specific activity citrate synthase (U/mg protein)
0	0.36±0.05	0.00±0.00	0.0038±0.0008	0.1453±0.0014
3	1.43±0.00	0.14±0.00	0.0304±0.0018	0.3591±0.0077
6	4.63±0.06	0.93±0.02	0.0246±0.0031	0.4452±0.0016
9	11.50±0.00	2.93±0.00	0.0201±0.0044	0.4832±0.0092
12	17.61±0.71	3.92±0.03	0.0207±0.0028	0.4928±0.0079
15	17.21±0.06	3.55±0.00	0.0193±0.0016	0.4806±0.0015
18	15.96±0.04	2.37±0.01	0.0008±0.0000	0.4806±0.0016
21	15.94±0.13	1.89±0.00	0.0004±0.0000	0.4762±0.0082
24	15.38±0.57	2.00±0.01	0.0004±0.0000	0.4151±0.0078

หมายเหตุ: ±SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

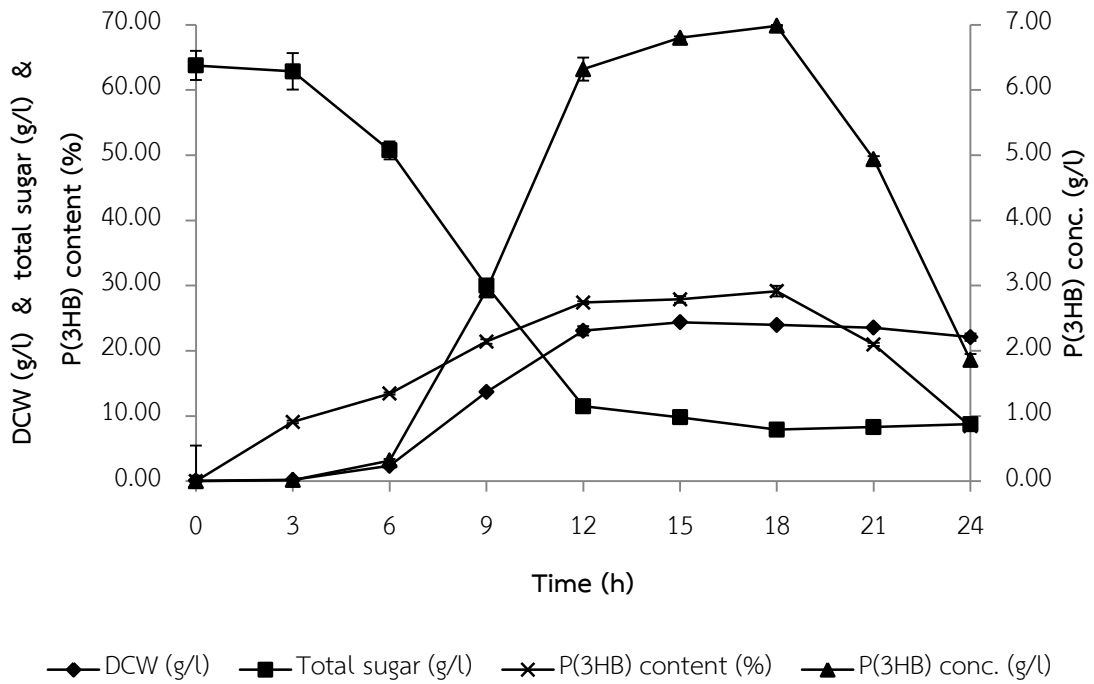


รูปที่ 21 นำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 40% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน

ตารางที่ 17 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 60% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.06±0.05	63.78±2.23	0.00±0.00	0.00±0.00
3	0.19±0.00	62.87±2.79	0.02±0.01	9.09±0.21
6	2.36±0.06	50.74±1.39	0.32±0.02	13.43±0.17
9	13.67±0.00	29.99±0.73	2.93±0.01	21.42±0.32
12	23.07±0.71	11.48±0.14	6.32±0.18	27.4±0.21
15	24.39±0.06	9.79±0.17	6.80±0.02	27.88±0.51
18	23.97±0.04	7.91±0.38	6.99±0.01	29.15±0.82
21	23.55±0.13	8.31±0.10	4.94±0.05	20.98±0.23
24	22.09±0.57	8.75±0.14	1.86±0.09	8.41±0.35

หมายเหตุ: ±SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

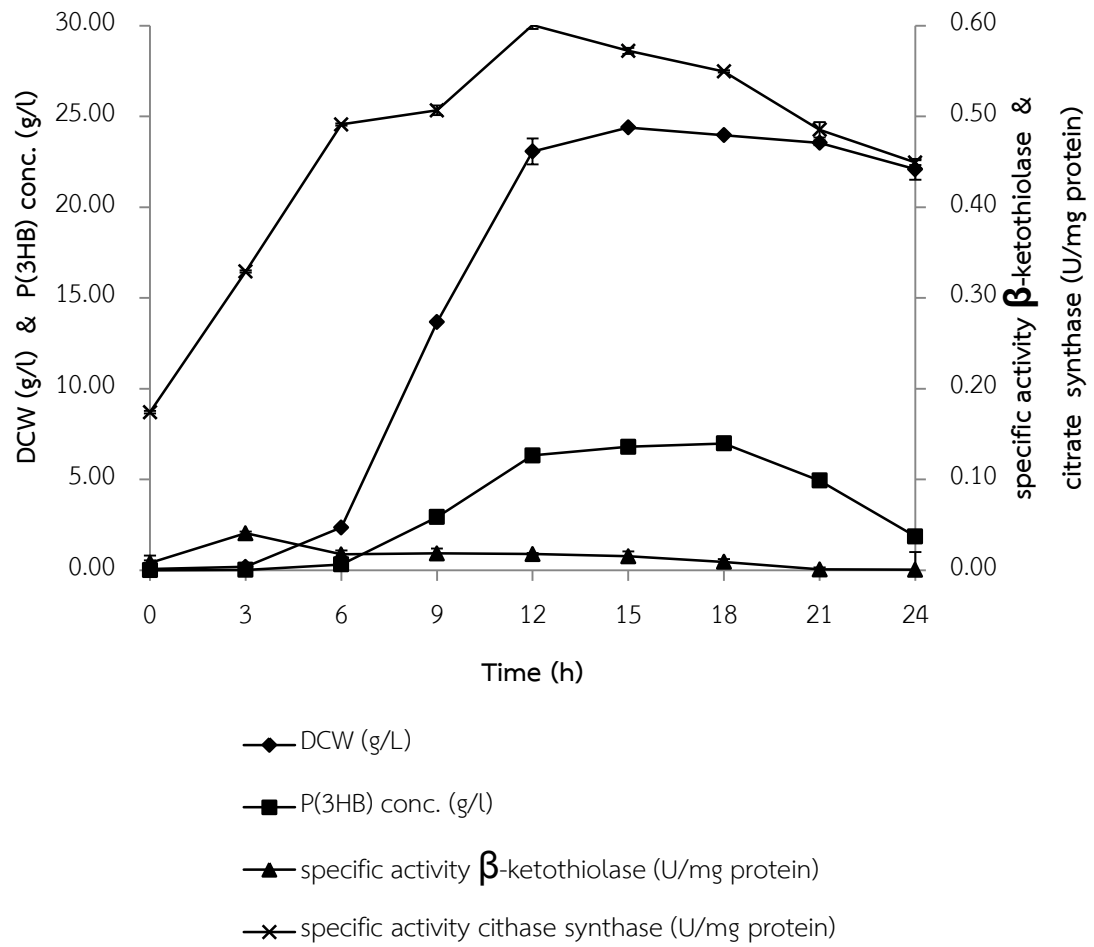


รูปที่ 22 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 60% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน

ตารางที่ 18 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของปีต้า-คีโตไทโธเลส แอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 60% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน

Time (h)	DCW (g/L)	P(3HB) conc. (g/L)	specific activity β -ketothiolase (U/mg protein)	specific activity citrate synthase (U/mg protein)
0	0.06±0.05	0.00±0.00	0.0081±0.003	0.174±0.0014
3	0.19±0.00	0.02±0.01	0.0408±0.0019	0.3291±0.0013
6	2.36±0.06	0.32±0.02	0.0175±0.0043	0.4913±0.0012
9	13.67±0.00	2.93±0.01	0.0185±0.0054	0.5067±0.0053
12	23.07±0.71	6.32±0.18	0.0178±0.0013	0.6007±0.0042
15	24.39±0.06	6.80±0.02	0.0153±0.0054	0.5723±0.0033
18	23.97±0.04	6.99±0.01	0.0091±0.0002	0.5496±0.0012
21	23.55±0.13	4.94±0.05	0.0009±0.0002	0.4854±0.0084
24	22.09±0.57	1.86±0.09	0.0006±0.0001	0.4491±0.0028

หมายเหตุ: ±SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

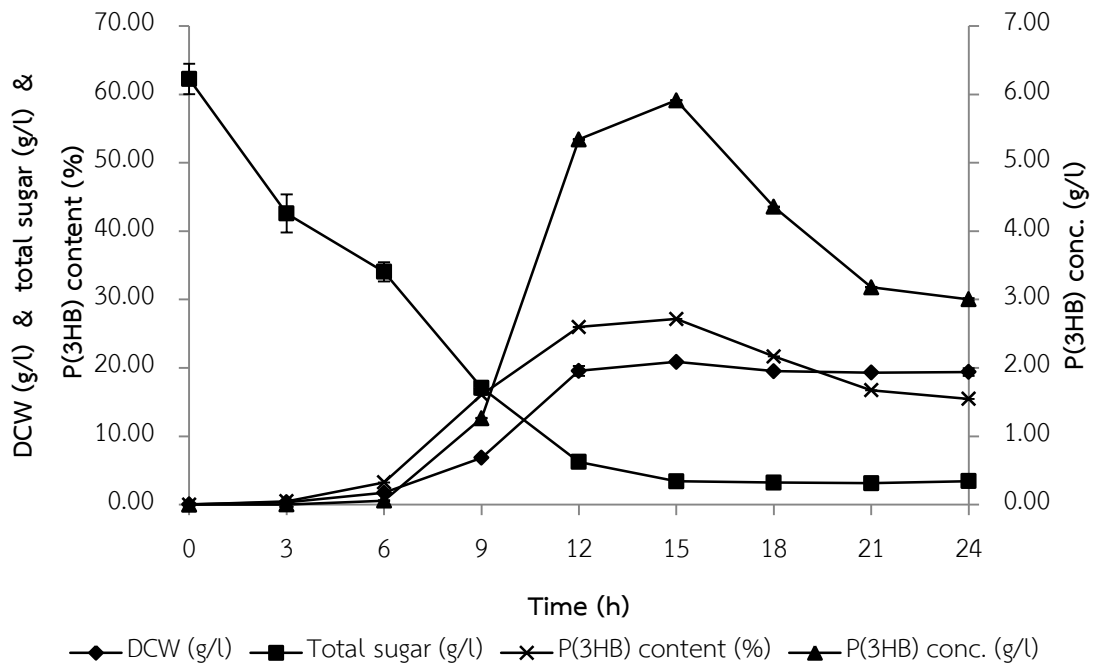


รูปที่ 23 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของปีต้า-คีโตไทโอเลส และแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 60% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน

ตารางที่ 19 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 80% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.04±0.05	62.25±2.23	0.00±0.00	0.00±0.00
3	0.36±0.00	42.58±2.79	0.00±0.01	0.50±0.00
6	1.75±0.06	34.06±1.39	0.06±0.00	3.25±0.00
9	6.87±0.00	17.08±0.73	1.26±0.00	16.08±0.01
12	19.56±0.71	6.26±0.14	5.34±0.00	25.97±0.00
15	20.87±0.06	3.43±0.17	5.91±0.00	27.15±0.00
18	19.52±0.04	3.23±0.38	4.36±0.00	21.67±0.00
21	19.31±0.13	3.13±0.10	3.18±0.00	16.73±0.00
24	19.4±0.57	3.45±0.14	3.00±0.02	15.48±0.00

หมายเหตุ: ±SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

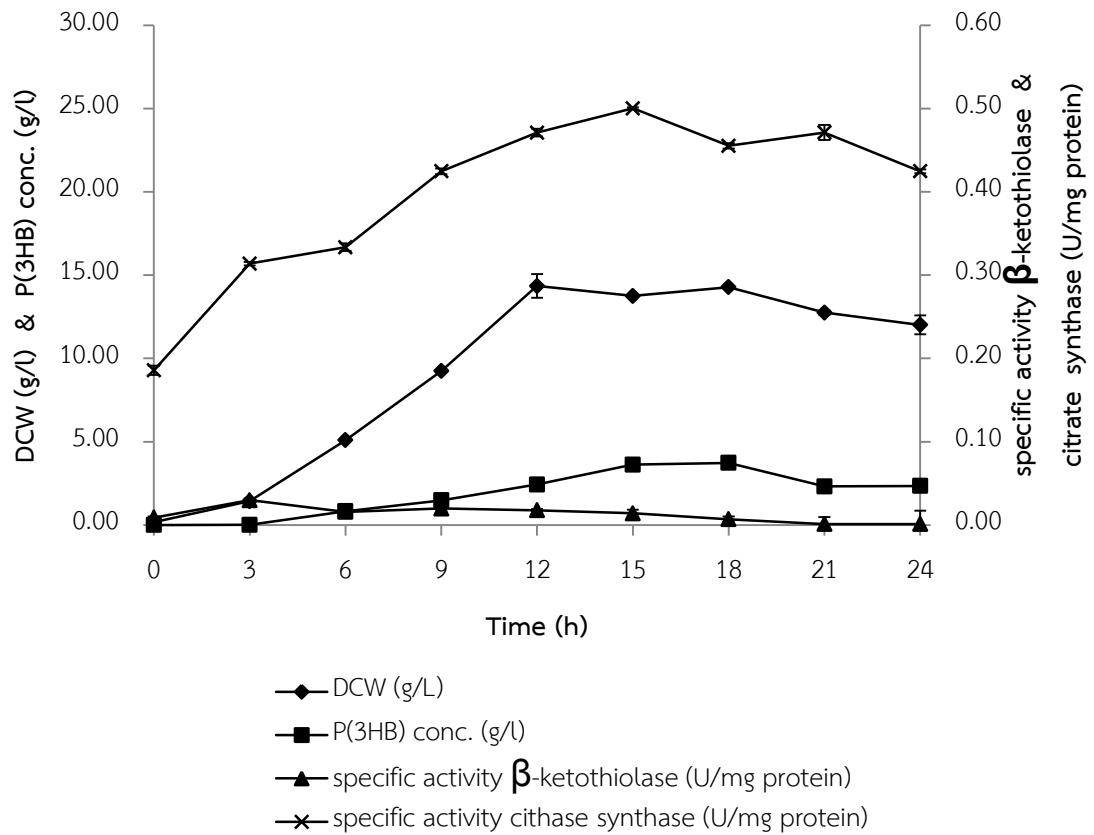


รูปที่ 24 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 80% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน

ตารางที่ 20 หน้าหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 80% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน

Time (h)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	specific activity β -ketothiolase (U/mg protein)	specific activity citrate synthase (U/mg protein)
0	0.04±0.05	0.00±0.00	0.0088±0.0004	0.1857±0.0054
3	0.36±0.00	0.00±0.01	0.0298±0.0012	0.3138±0.0022
6	1.75±0.06	0.06±0.00	0.0158±0.0023	0.3335±0.0045
9	6.87±0.00	1.26±0.00	0.0198±0.0034	0.4248±0.0035
12	19.56±0.71	5.34±0.00	0.0178±0.0012	0.4710±0.0046
15	20.87±0.06	5.91±0.00	0.0141±0.0043	0.5002±0.0012
18	19.52±0.04	4.36±0.00	0.0069±0.0005	0.4552±0.0032
21	19.31±0.13	3.18±0.00	0.0012±0.0000	0.4713±0.009
24	19.40±0.57	3.00±0.02	0.0012±0.0001	0.4247±0.0024

หมายเหตุ: \pm SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

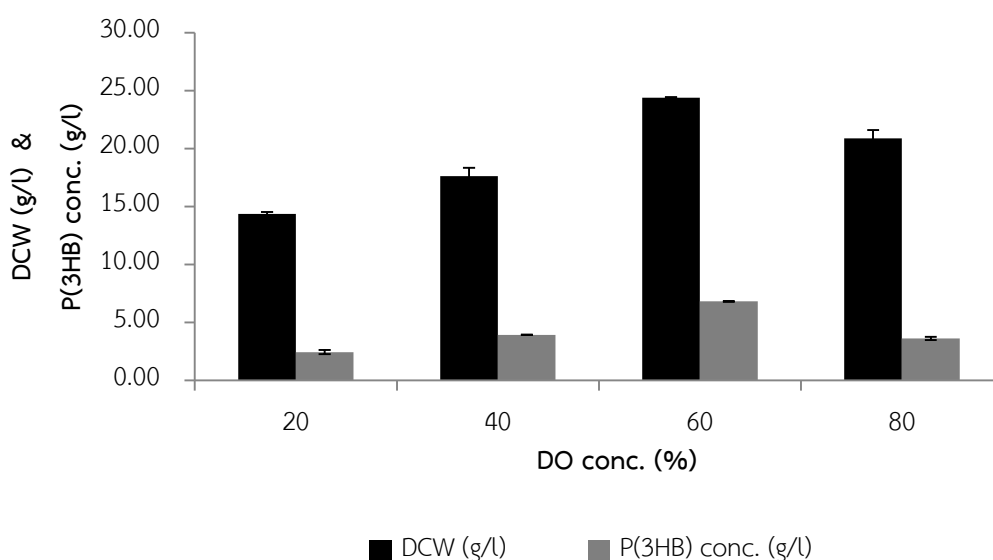


รูปที่ 25 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 80% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน

ตารางที่ 21 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของ P(3HB) สูงที่สุด เมื่อแปรปริมาณ ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20 40 60 และ 80% ของค่าความอิ่มตัวของ ออกซิเจน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

DO conc. (%)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)
20	14.35±0.16	2.43±0.18
40	17.61±0.71	3.92±0.03
60	24.39±0.06	6.80±0.02
80	20.87±0.06	3.43±0.17

หมายเหตุ: ±SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

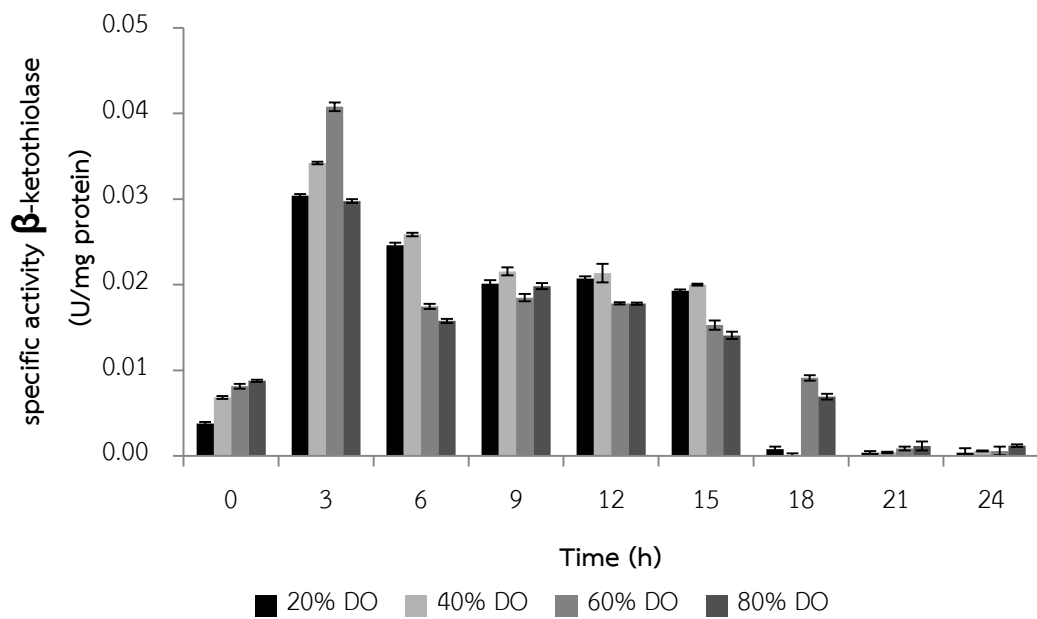


รูปที่ 26 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของ P(3HB) สูงที่สุด เมื่อแปรปริมาณ ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20 40 60 และ 80% ของค่าความอิ่มตัวของ ออกซิเจน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 22 เปรียบเทียบแอกติวิตีของปีต้า-คีโตไทโธเลส เมื่อแปรปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20 40 60 และ 80% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Time (h)	specific activity of β -ketothiolase (U/mg protein)			
	DO concentration (%)			
	20	40	60	80
0	0.0038±0.0008	0.0068±0.0008	0.0081±0.0030	0.0088±0.0004
3	0.0304±0.0018	0.0342±0.0015	0.0408±0.0019	0.0298±0.0012
6	0.0246±0.0031	0.0259±0.0021	0.0175±0.0043	0.0158±0.0023
9	0.0201±0.0044	0.0216±0.0047	0.0185±0.0054	0.0198±0.0034
12	0.0207±0.0028	0.0213±0.0018	0.0178±0.0013	0.0178±0.0012
15	0.0193±0.0016	0.0200±0.0011	0.0153±0.0054	0.0141±0.0043
18	0.0008±0.0000	0.0001±0.0000	0.0091±0.0002	0.0069±0.0005
21	0.0004±0.0000	0.0004±0.0000	0.0009±0.0002	0.0012±0.0000
24	0.0004±0.0000	0.0006±0.0000	0.0006±0.0001	0.0012±0.0001

หมายเหตุ: \pm SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

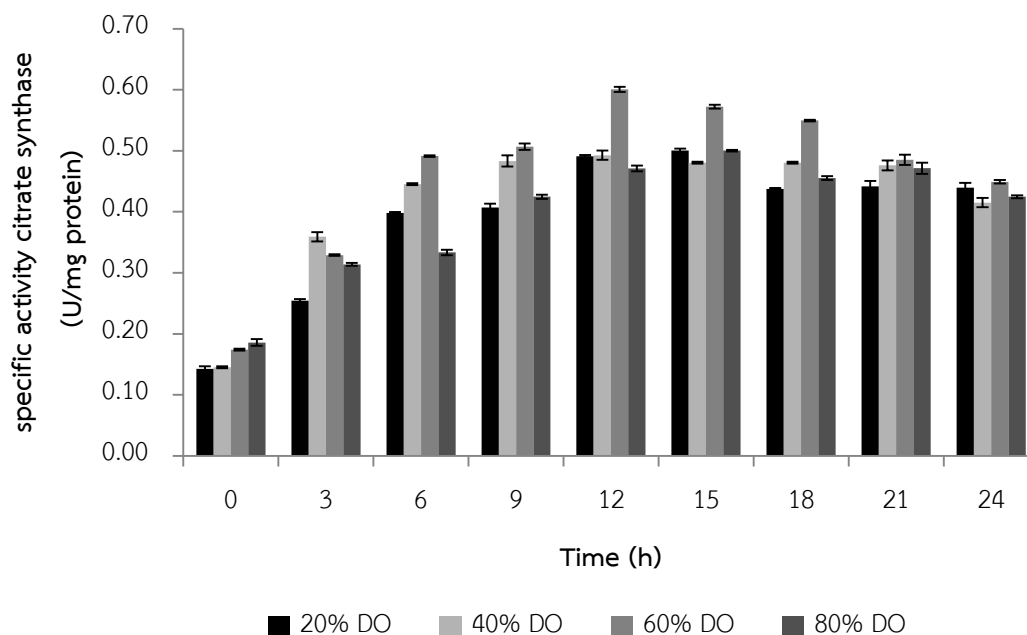


รูปที่ 27 เปรียบเทียบแอกติวิตีของบีต้า-คีโตไทโธเลส เมื่อแปรปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20 40 60 และ 80% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 23 เปรียบเทียบแอกติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อแปรปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหาร เลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20 40 60 และ 80% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Time (h)	specific activity of citrate synthase (U/mg protein)			
	DO concentration (%)			
	20	40	60	80
0	0.1425±0.0044	0.1453±0.0014	0.1740±0.0014	0.1857±0.0054
3	0.2541±0.0028	0.3591±0.0008	0.3291±0.0013	0.3138±0.0022
6	0.3981±0.0014	0.4452±0.0016	0.4913±0.0012	0.3335±0.0045
9	0.4072±0.0009	0.4832±0.0002	0.5067±0.0053	0.4248±0.0035
12	0.4911±0.0018	0.4928±0.0009	0.6007±0.0042	0.4710±0.0046
15	0.5003±0.0032	0.4806±0.0015	0.5723±0.0033	0.5002±0.0012
18	0.4377±0.0013	0.4806±0.0016	0.5496±0.0012	0.4552±0.0032
21	0.4417±0.0009	0.4762±0.0002	0.4854±0.0084	0.4713±0.0090
24	0.4397±0.0078	0.4151±0.0008	0.4491±0.0028	0.4247±0.0024

หมายเหตุ: ±SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ



รูปที่ 28 เปรียบเทียบแอกติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อแปรปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20 40 60 และ 80% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมมีผลต่อการเจริญและอัตราเมตาบอลิซึมของเซลล์จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ และกระบวนการสังเคราะห์สารชนิดต่างๆ (Harrison และ Pirt, 1967) ในทางตรงกันข้ามหากมีปริมาณออกซิเจนที่มากเกินไปก็จะเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญที่ช้าหรือไม่มีการเจริญเลย (Moore และ Williams, 1911) *B. megaterium* เป็นแบคทีเรียชนิดที่ต้องอาศัยออกซิเจนในการเจริญ (Naranjo และคณะ, 2013) ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ *B. megaterium* BA-019 เป็นจุลินทรีย์ในการผลิต P(3HB) จึงจำเป็นที่จะต้องควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์และปริมาณของ P(3HB) สูง จากการศึกษาพบว่าปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญและการสังเคราะห์ P(3HB) คือ 60% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน ซึ่งทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 24.39 ± 0.06 และ 6.99 ± 0.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ 15 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และมีแอกติวิตีของเอนไซม์ซิเตรท ซินเทส และปีต้า-คีโตไทโอเลสเท่ากับ 0.6007 ± 0.0042 และ 0.0408 ± 0.0019 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ที่เวลา 12 และ 3 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าแอกติวิตีของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20 40 และ 80% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน โดยแอกติวิตีของซิเตรท ซินเทสมีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ *B. megaterium* BA-019 กล่าวคือ เมื่อ

แอกติวิตีของซิเตรท ซินเทสมีค่าสูงขึ้น ปริมาณเซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 ก็มีค่าสูงขึ้นเช่นเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากซิเตรท ซินเทสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในวิถี TCA ซึ่งเป็นวิถีหลักที่ใช้ในการสร้างพลังงานให้แก่แบคทีเรียสำหรับการเจริญ และสร้างสารผลิตภัณฑ์ (Johnson และ Hanson, 1974) แต่แอกติวิตีของปีต้า-คีโตไทโอเลสไม่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของ P(3HB) ที่สังเคราะห์ได้ กล่าวคือ แอกติวิตีของปีต้า-คีโตไทโอเลส เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ และลดลงในเวลาต่อมา แต่ความเข้มข้นของ P(3HB) เพิ่มสูงขึ้นระหว่างช่วงที่ 9 ถึงช่วงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ และค่อยๆลดลงในเวลาต่อมา ทั้งนี้อาจเนื่องจากปีต้า-คีโตไทโอเลส เป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีชีวสังเคราะห์ของ P(3HB) ทำหน้าที่รวมแอสทิล-โคเอ 2 โมเลกุลเป็นอะซิโตอะเซทิล-โคเอ หลังจากนั้นอะซิโตอะเซทิล-โคเอถูกคะตะไลซ์โดยอะซิโตอะเซทิล-โคเอ ริดักเทส ทำให้ปีต้า-คีโตไทโอเลสมีแอกติวิตีลดลง

เมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) ในภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 80% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน พบว่ามีค่าน้อยกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 60% อาจเนื่องมาจากปริมาณออกซิเจนที่มีมากเกินไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถยับยั้งหรือหยุดการเจริญของแบคทีเรียได้ (Moore และ Williams, 1911) ความเข้มข้นของออกซิเจนในปริมาณที่สูงเกินไปจะส่งผลให้มีการยับยั้ง energy-linked pyridine nucleotide ในไมโตรคอนเดรีย และมีผลต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันของหมู่ซัลไฟดิล (sulphydryl groups) (Barron, 1955; Chance และคณะ, 1965) นอกจากนี้ความเร็วรอบของใบกวนที่สูงเกินไปอาจทำให้เกิดแรงเฉือน (shear stress) ที่มากส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียถูกทำลาย เพราะฉะนั้นปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 80% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน จึงไม่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เพื่อผลิต P(3HB)

4.3 การเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดซิตริกที่มีต่อการเจริญ และการผลิต P(3HB) โดยการตรวจติดตามแอกติวิตีของซิเตรท ซินเทส และปีต้า-คีโตไทโอเลส

การปรับปรุงและควบคุมการผลิต P(3HB) สามารถทำได้หลายประการ ได้แก่ การปรับปรุงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการเจริญและการผลิต (P3HB) การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) การควบคุมวิถีชีวสังเคราะห์ของ P(3HB) ในระดับต่างๆ รวมทั้งอาจใช้วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม ทั้งนี้คณะผู้วิจัยมีการศึกษาและพัฒนาการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เพื่อผลิต P(3HB) กันมาอย่างต่อเนื่อง ทั้งในด้านการปรับปรุงสูตรอาหารที่ใช้สำหรับการผลิต P(3HB) การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการผลิต P(3HB) ในปัจจัยต่างๆ รวมไปถึงการขยายส่วนการผลิต คณะผู้วิจัยดังได้ทำการศึกษาค้นคว้าปริมาณเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) ที่เพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งในส่วนของพัฒนากระบวนการแยกและทำบริสุทธิ์สาร P(3HB) เพื่อให้ได้วิธีการที่ลดขั้นตอนลง และใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีราคาถูก และไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม (สุกฤทัย พัฒนศิริพัฒน์, 2556)

โดยทั่วไปอะเซทิล-โคเอที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแหล่งคาร์บอนจะถูกแมบอไลต์ต่อไปเป็นสารมัธยันตร์ในวิถี TCA อะเซทิล-โคเอจะถูกเปลี่ยนเป็นพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญ รวมทั้งมีปล่อย CoASH อีสระออกมา หากมี CoASH อีสระมากเกินไปจะส่งผลให้ยับยั้งการทำงานของปีต้า-คีโตไทโอเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกที่ใช้ในการสังเคราะห์ P(3HB) ส่งผลทำให้อะเซทิล-โคเอไม่เข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ P(3HB) จึงมีการผลิต P(3HB) ในปริมาณที่น้อยหรือไม่มีการผลิตเลย (Pardelha และคณะ, 2012) ผู้วิจัยจึงเห็นว่า หากมีการควบคุมวิถีชีวสังเคราะห์ให้มีการผลิต P(3HB) และทำให้จุลินทรีย์มีการสร้างพลังงานเพื่อการเจริญในเวลาเดียวกัน ก็จะมีผลทำให้จุลินทรีย์มีการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น เนื่องมาจากการสะสม P(3HB) จะถูกสะสมอยู่ภายในแกรนูลซึ่งอยู่ภายในเซลล์จุลินทรีย์ และเมื่อมีปริมาณเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้น ก็จะส่งผลทำให้มีการสะสม P(3HB) ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย

Hao และคณะ (2012) พบว่าการเติมสารมัธยันตร์บางชนิดในวิถี TCA ลงในอาหารสำหรับการผลิต P(3HB) มีผลให้ *Methylosinus trichosporium* IMV3011 มีการผลิต P(3HB) ในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้น เนื่องมาจากสารมัธยันตร์บางชนิดในวิถี TCA ทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์ในวิถีชีวสังเคราะห์ P(3HB) สูงขึ้น ดังนั้นหากมีการเติมกรดซิตริก ซึ่งเป็นสารมัธยันตร์ชนิดหนึ่งในวิถี TCA ในปริมาณที่เหมาะสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ก็อาจทำให้มีปริมาณเซลล์และปริมาณ P(3HB) ที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่ได้เติมกรดซิตริก

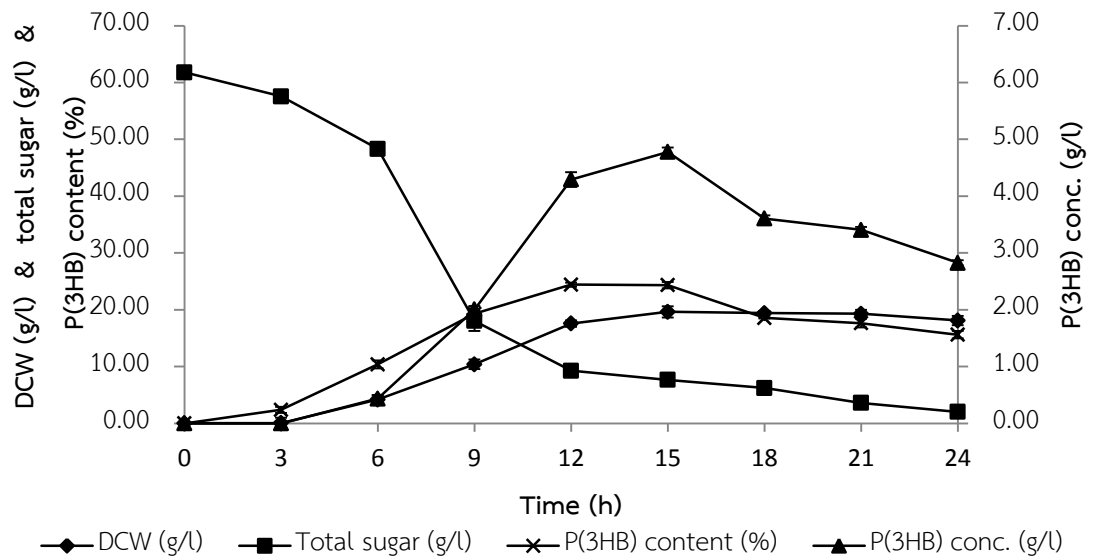
จากผลการวิจัยที่ได้ตามข้อที่ 4.2 งานวิจัยในขั้นตอนนี้จึงเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในภาวะที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 60 กรัมต่อลิตร ควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 60% ของค่าความอิ่มตัวของ ออกซิเจน และแปรการเติมกรดซิตริกด้วยความเข้มข้นต่างๆ คือ 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร ลงใน อาหาร MSM ตามวิธีในข้อ 3.3.6 พบว่าการศึกษาผลของการเติมกรดซิตริกทั้ง 6 ภาวะมีรูปแบบการ เจริญที่เป็นไปในทางเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 23 26 28 30 31 และ 32 และรูปที่ 29 31 33 35 37 และ 39 คือ มีระยะ lag phase ช่วง 3 ชั่วโมงแรกของการเจริญ ระยะ log phase ที่เวลา 6-12 ชั่วโมง และหลังจาก 12 ชั่วโมงไปแล้วจะเข้าสู่ระยะ stationary phase โดยมีปริมาณเซลล์ที่แตกต่าง กันไป เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ P(3HB) (ตารางที่ 36 และรูปที่ 41) พบว่าการ เติมกรดซิตริกที่มีความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 26 และรูปที่ 31) ในอาหารสำหรับการผลิต P(3HB) เป็นภาวะที่ได้เซลล์และผลิต P(3HB) น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับการเติมกรดซิตริกด้วยความ เข้มข้นอื่นๆ กล่าวคือ ที่เวลา 15 ชั่วโมง มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 20.34 ± 0.45 กรัมต่อลิตร และมีการผลิต P(3HB) เท่ากับ 5.96 ± 0.04 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับภาวะที่ไม่เติมกรด ซิตริก การเติมกรดซิตริกความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตรเป็นภาวะที่ทำให้มีการเจริญและผลิต P(3HB) ได้ ดีกว่าการไม่เติมกรดซิตริก ส่วนภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ ภาวะที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้น 2 กรัม ต่อลิตร (ตารางที่ 28 และรูปที่ 33) โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 เท่ากับ 29.93 ± 0.29 กรัมต่อลิตร และมีการผลิต P(3HB) สูงสุดคือ 8.71 ± 0.18 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาแอกติวิตีของซิเตรท ซินเทส และปีต้า-คีโตไทโอเลส (ตารางที่ 25 27 29 31 33 และ 35 และรูปที่ 30 32 34 36 38 และ 40) พบว่าแอกติวิตีของซิเตรท ซินเทสมีความสอดคล้องกับ รูปแบบการเจริญของเซลล์ กล่าวคือ เมื่อมีการเจริญเพิ่มสูงขึ้น แอกติวิตีของซิเตรท ซินเทสก็มีเพิ่ม สูงขึ้นเช่นเดียวกัน แต่แอกติวิตีของปีต้า-คีโตไทโอเลสจะมีเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ และแอกติวิตีลดลงในเวลาต่อมา เช่นเดียวกับงานวิจัยในขั้นที่ 4.2 และเมื่อ เปรียบเทียบแอกติวิตีของซิเตรท ซินเทสและปีต้า-คีโตไทโอเลสใน 6 ภาวะ ดังแสดงในรูปที่ 42 และ 43 พบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์ภายในเซลล์ที่มีการเติมกรดซิตริกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มสูงขึ้นเมื่อ เทียบกับแอกติวิตีของเอนไซม์ในภาวะที่ไม่ได้เติมกรดซิตริก โดยภาวะที่ทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์ทั้ง สองดังกล่าวสูงที่สุดคือ ภาวะที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 29 และรูปที่ 34) ซึ่งซิเตรท ซินเทสมีแอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 2.4923 ± 0.061 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่าเมื่อเทียบกับภาวะที่ไม่ได้เติมกรดซิตริก ส่วนแอกติวิตีสูงสุดของปีต้า-คีโตไทโอเลสเท่ากับ 1.1584 ± 0.0002 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 60 เท่าเมื่อเทียบกับภาวะที่ไม่ได้เติม กรดซิตริก

ตารางที่ 24 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกรดซิตริก

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.02±0.05	61.78±0.35	0.00±0.00	0.00±0.00
3	0.06±0.04	57.58±0.13	0.00±0.10	2.39±0.53
6	4.21±0.68	48.32±0.11	0.44±0.06	10.39±0.72
9	10.4±0.83	18.04±1.77	2.01±0.06	19.30±0.12
12	17.58±0.58	9.27±0.07	4.29±0.13	24.42±0.36
15	19.64±1.00	7.65±0.40	4.78±0.08	24.34±0.58
18	19.42±0.35	6.23±0.12	3.61±0.06	18.57±0.12
21	19.31±0.71	3.61±0.19	3.41±0.05	17.64±0.76
24	18.11±0.81	2.04±0.90	2.83±0.04	15.61±0.65

หมายเหตุ: ±SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

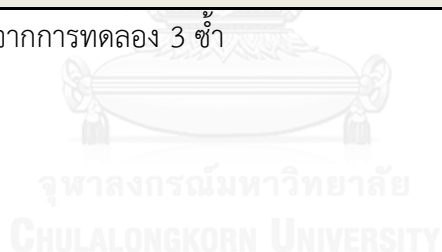


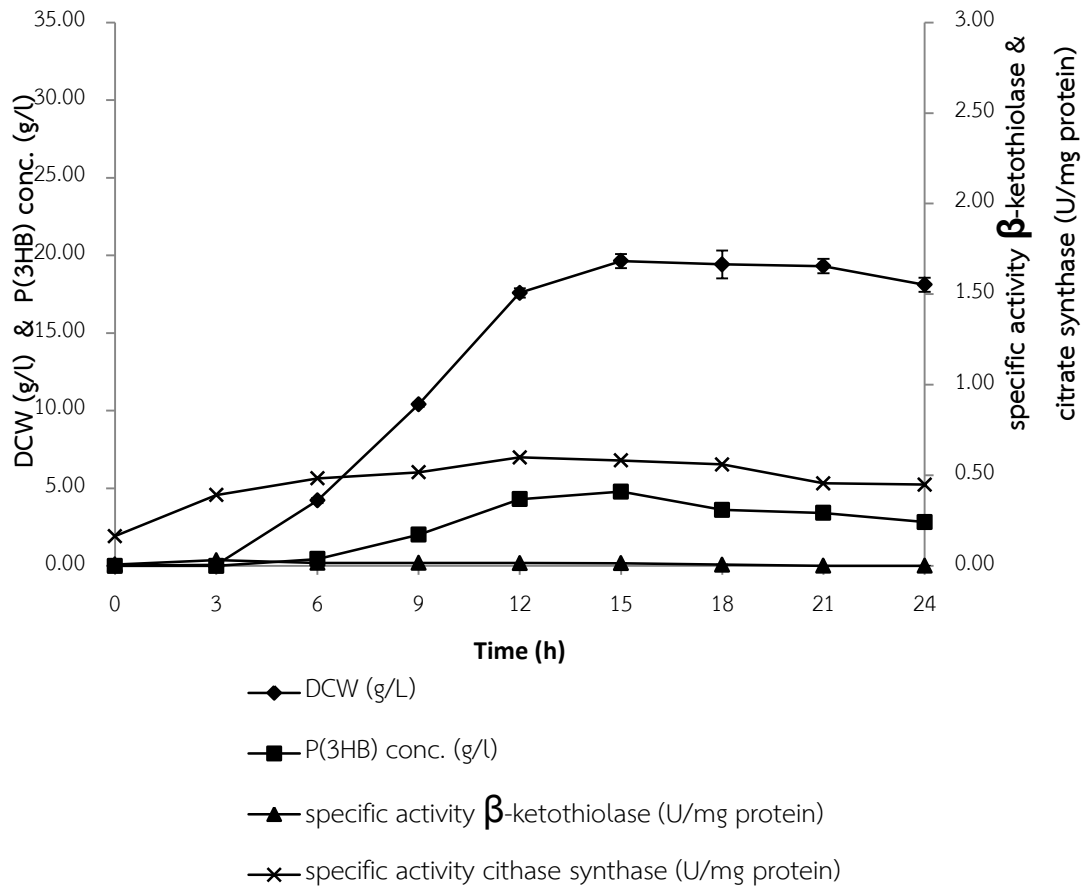
รูปที่ 29 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกรดซิตริก

ตารางที่ 25 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกรดซิตริก

Time (h)	DCW (g/L)	P(3HB) conc. (g/L)	specific activity β -ketothiolase (U/mg protein)	specific activity citrate synthase (U/mg protein)
0	0.02±0.05	0.00±0.00	0.0081±0.0004	0.1640±0.044
3	0.06±0.04	0.00±0.10	0.0318±0.0005	0.3910±0.0277
6	4.21±0.68	0.44±0.06	0.0168±0.0001	0.4830±0.0610
9	10.4±0.83	2.01±0.06	0.0165±0.0004	0.5167±0.0534
12	17.58±0.58	4.29±0.13	0.0158±0.0007	0.5990±0.0150
15	19.64±1.00	4.78±0.08	0.0150±0.0001	0.5823±0.0310
18	19.42±0.35	3.61±0.06	0.0071±0.0002	0.5596±0.0110
21	19.31±0.71	3.41±0.05	0.0009±0.0000	0.4554±0.0919
24	18.11±0.81	2.83±0.04	0.0006±0.0000	0.4491±0.0800

หมายเหตุ: \pm SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ



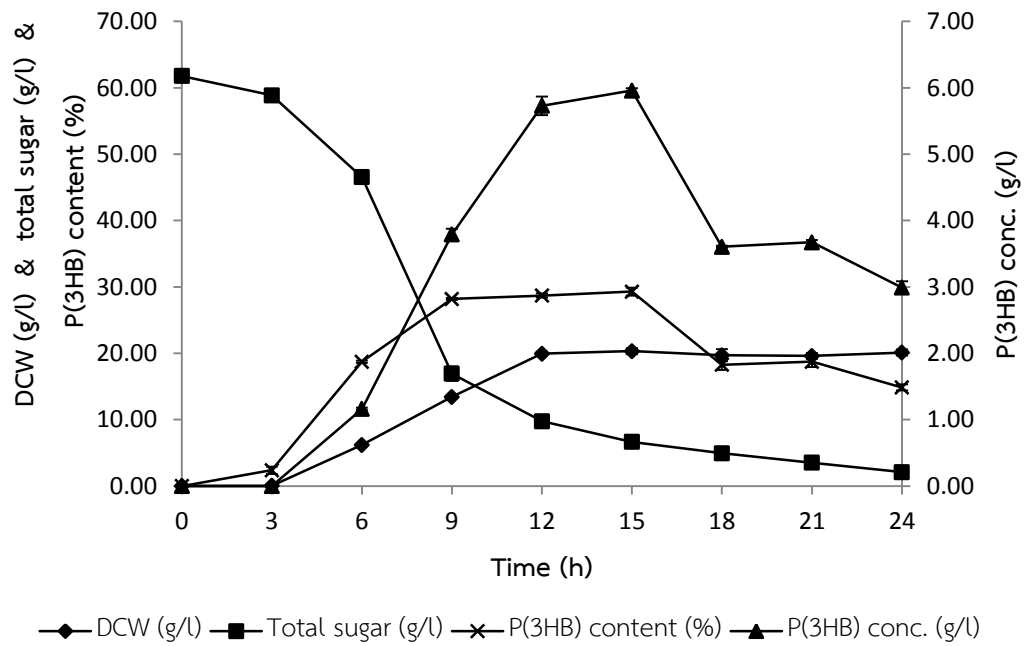


รูปที่ 30 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกรดซิตริก

ตารางที่ 26 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้น เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.02±0.05	61.78±0.35	0.00±0.00	0.00±0.00
3	0.06±0.19	58.87±0.17	0.00±0.03	2.39±0.56
6	6.21±0.17	46.55±0.10	1.16±0.02	18.74±0.17
9	13.44±0.14	16.93±1.08	3.79±0.09	28.20±0.16
12	19.96±0.31	9.76±0.07	5.73±0.14	28.71±0.33
15	20.34±0.45	6.65±0.14	5.96±0.04	29.30±0.59
18	19.72±0.91	4.95±0.10	3.61±0.02	18.29±0.81
21	19.61±0.47	3.52±0.17	3.67±0.04	18.73±0.79
24	20.12±0.46	2.09±0.38	2.99±0.09	14.87±0.47

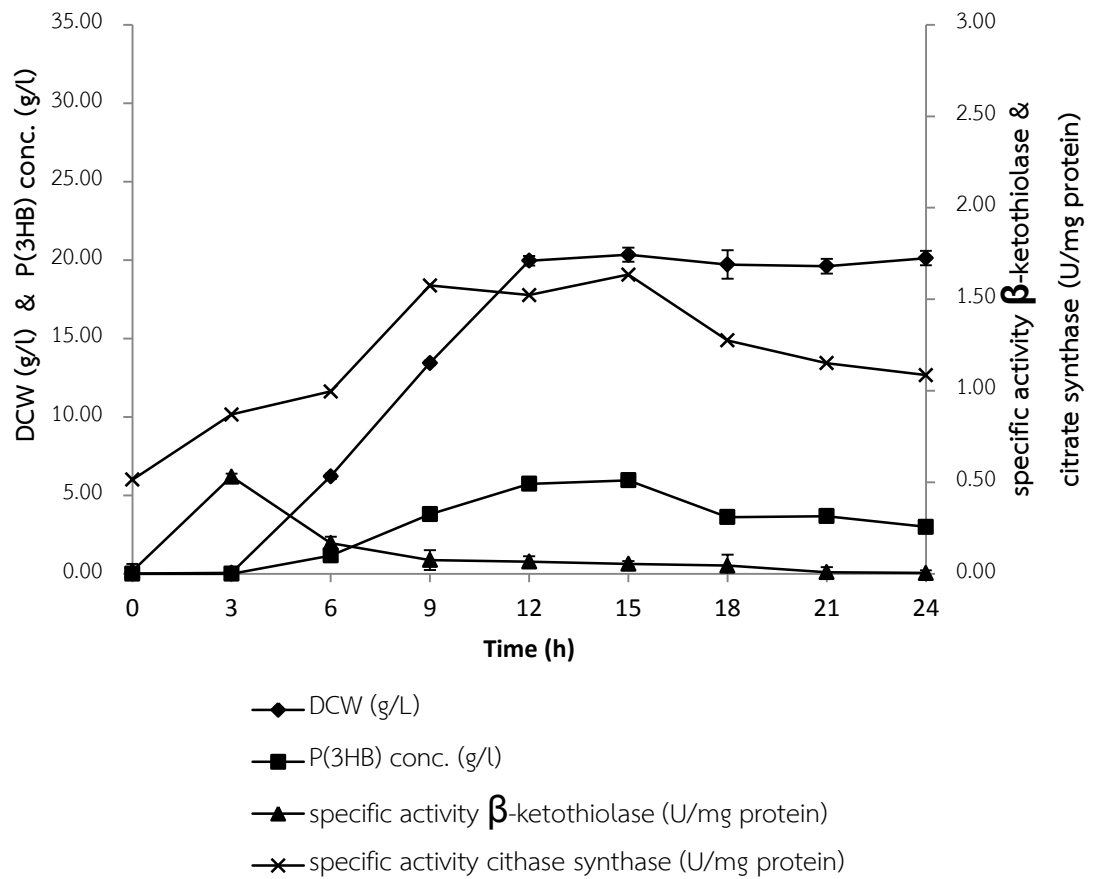
หมายเหตุ: ±SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ



รูปที่ 31 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้น เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 27 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร

Time (h)	DCW (g/L)	P(3HB) conc. (g/L)	specific activity β -ketothiolase (U/mg protein)	specific activity citrate synthase (U/mg protein)
0	0.02±0.05	0.00±0.00	0.0152±0.0003	0.5140±0.0944
3	0.06±0.19	0.00±0.03	0.5306±0.0001	0.8700±0.0298
6	6.21±0.17	1.16±0.02	0.1673±0.0003	0.9960±0.0161
9	13.44±0.14	3.79±0.09	0.0747±0.0005	1.5750±0.0859
12	19.96±0.31	5.73±0.14	0.0658±0.0008	1.523±0.0158
15	20.34±0.45	5.96±0.04	0.0537±0.0001	1.635±0.0351
18	19.72±0.91	3.61±0.02	0.0445±0.0002	1.275±0.0161
21	19.61±0.47	3.67±0.04	0.0087±0.0000	1.151±0.0859
24	20.12±0.46	2.99±0.09	0.0038±0.0005	1.085±0.0780

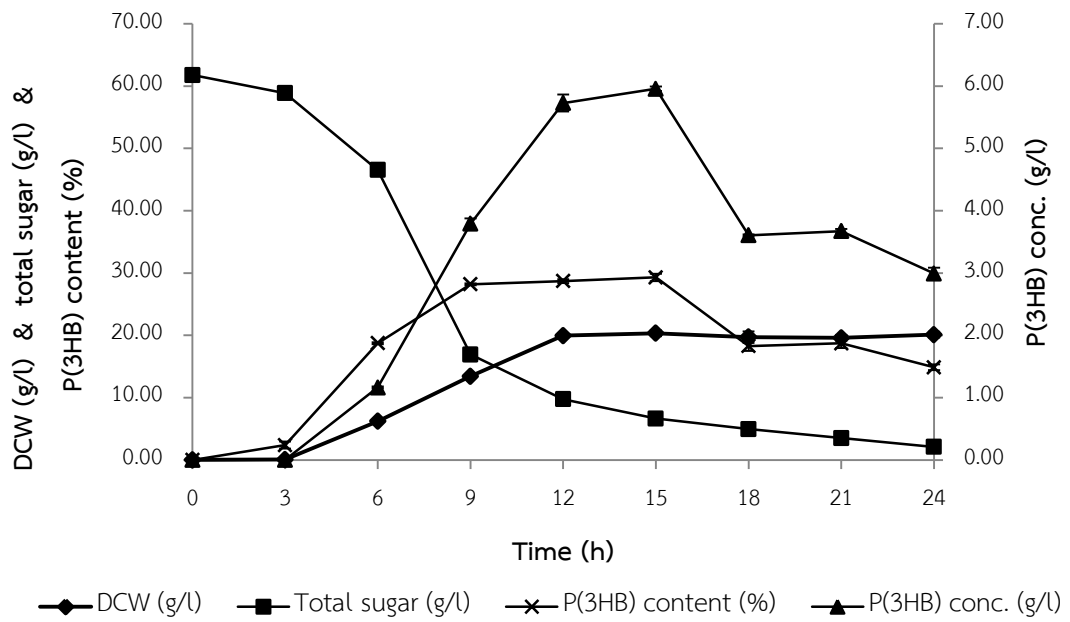


รูปที่ 32 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 28 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้น เท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.40±0.14	61.12±0.70	0.00±0.00	0.00±0.00
3	0.94±0.03	60.02±0.35	0.02±0.07	2.57±0.23
6	3.19±0.14	35.64±0.70	0.6±0.03	18.84±0.19
9	10.73±0.11	20.8±0.21	2.90±0.02	26.99±0.21
12	29.93±0.29	8.48±0.35	8.71±0.18	29.10±0.26
15	29.89±1.29	4.83±0.63	7.09±0.02	23.73±0.58
18	27.10±0.45	3.30±0.35	6.45±0.02	23.81±0.85
21	25.08±0.31	2.66±0.35	5.74±0.05	22.89±0.77
24	23.10±0.53	1.31±0.10	5.16±0.10	22.33±0.65

หมายเหตุ: ±SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

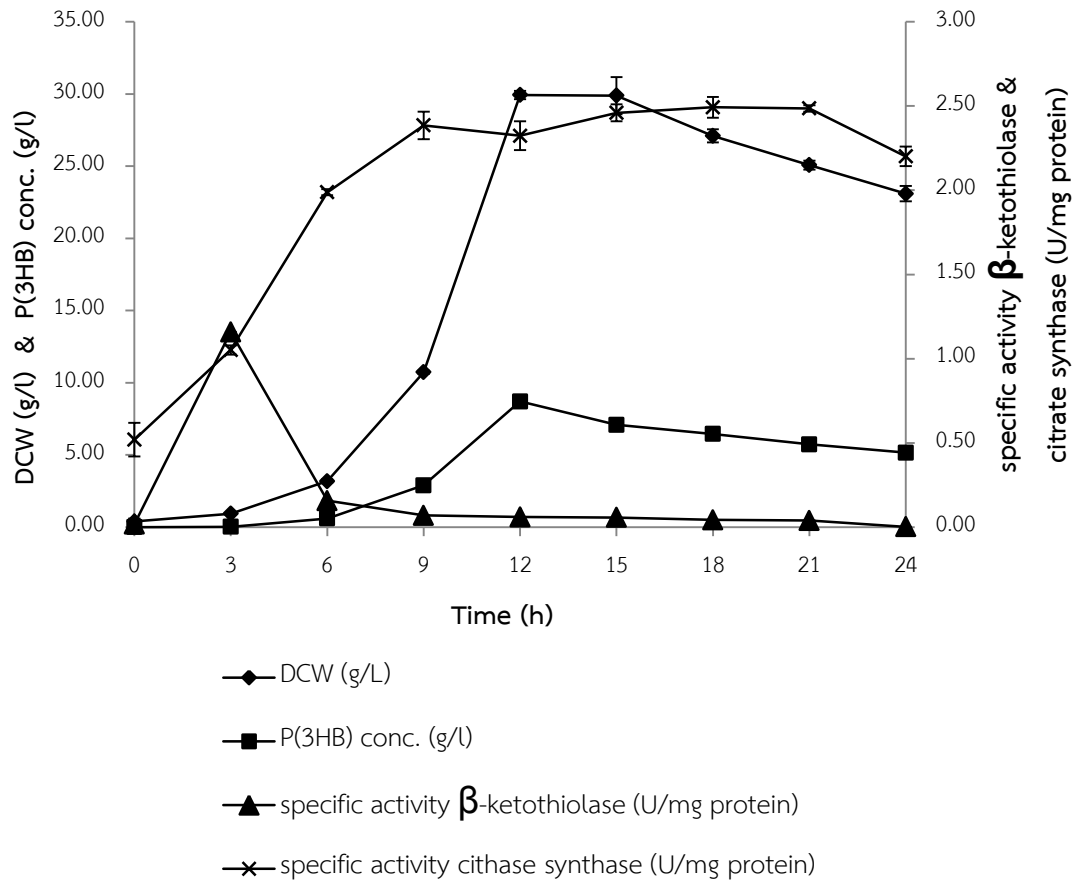


รูปที่ 33 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 29 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร

Time (h)	DCW (g/L)	P(3HB) conc. (g/L)	specific activity β -ketothiolase (U/mg protein)	specific activity citrate synthase (U/mg protein)
0	0.4±0.14	0.00±0.00	0.0172±0.0008	0.5191±0.0994
3	0.94±0.03	0.02±0.07	1.1584±0.0002	1.0517±0.0270
6	3.19±0.14	0.60±0.03	0.1570±0.0005	1.9881±0.0181
9	10.73±0.11	2.9±0.02	0.0702±0.0004	2.3854±0.0819
12	29.93±0.29	8.71±0.18	0.0606±0.0003	2.3239±0.0850
15	29.89±1.29	7.09±0.02	0.0574±0.0001	2.4595±0.051
18	27.10±0.45	6.45±0.02	0.0427±0.0009	2.4923±0.061
21	25.08±0.31	5.74±0.05	0.0397±0.0004	2.4861±0.019
24	23.10±0.53	5.16±0.10	0.0020±0.0002	2.2009±0.058

หมายเหตุ: ±SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

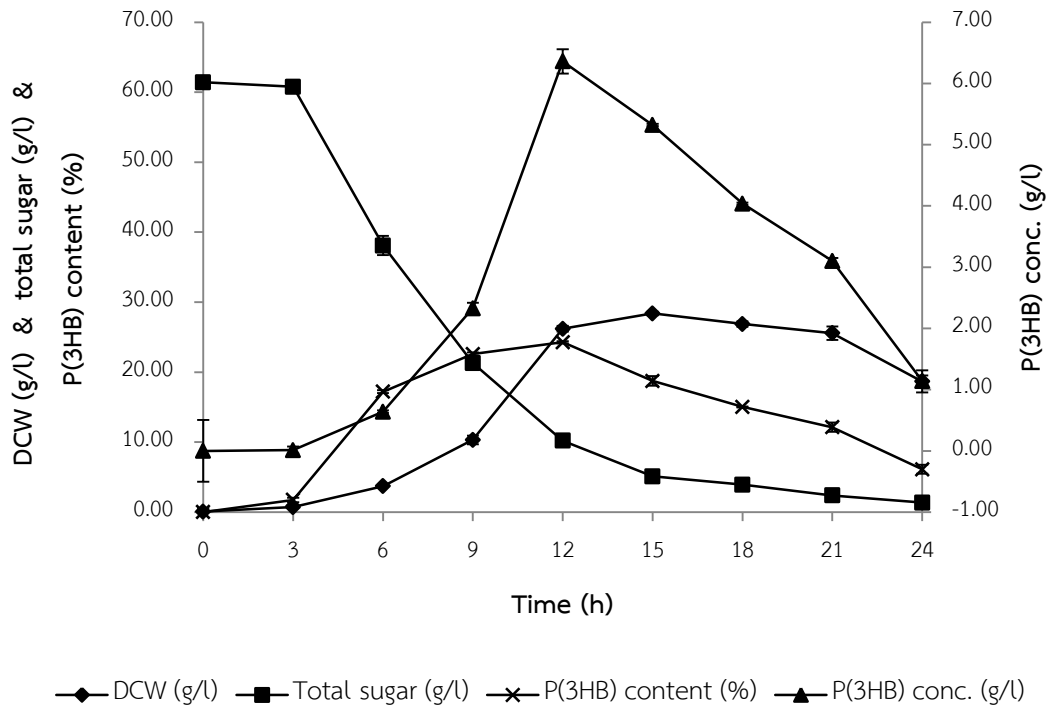


รูปที่ 34 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 30 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้น เท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.07±0.00	61.41±0.35	0.00±0.00	0.00±0.00
3	0.71±0.02	60.77±0.70	0.01±0.06	1.73±0.32
6	3.71±0.11	38.10±1.39	0.64±0.02	17.21±0.18
9	10.32±0.62	21.29±0.21	2.33±0.09	22.57±0.22
12	26.2±0.40	10.20±0.35	6.36±0.2	24.28±0.16
15	28.40±0.25	5.10±0.03	5.32±0.02	18.74±0.68
18	26.88±0.39	3.92±0.17	4.04±0.02	15.02±0.05
21	25.59±0.96	2.39±0.03	3.10±0.05	12.12±0.66
24	18.66±1.58	1.36±0.03	1.14±0.09	6.11±0.65

หมายเหตุ: ±SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

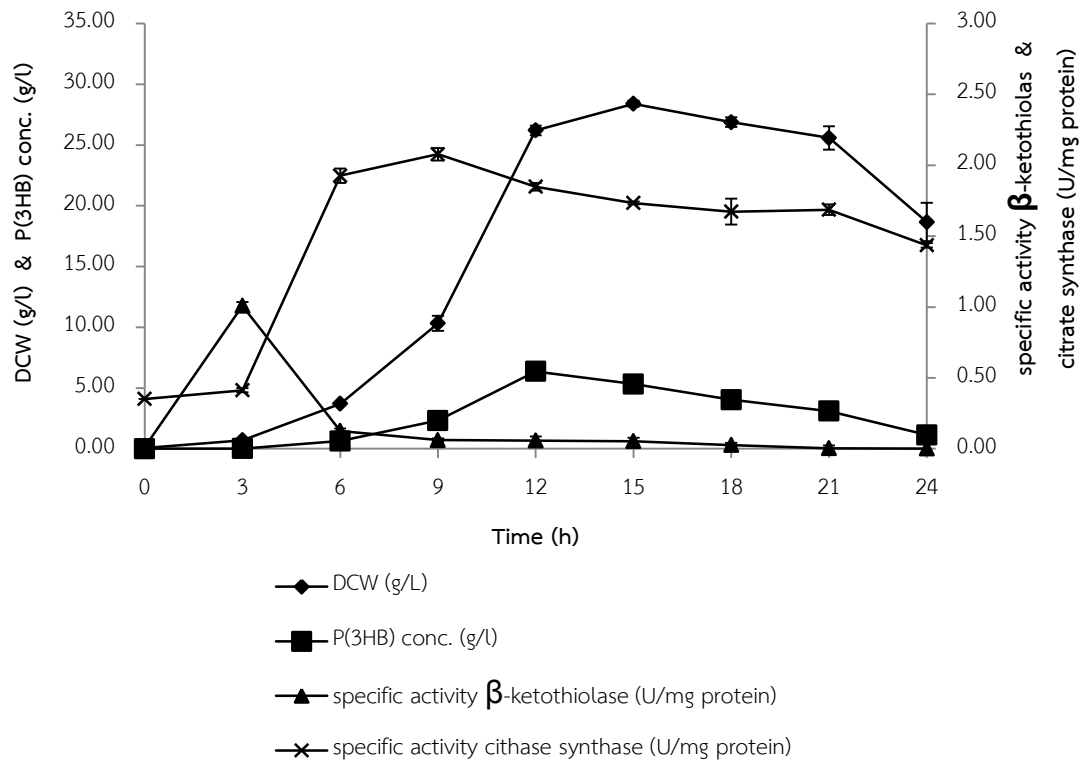


รูปที่ 35 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 31 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโกลเลส และแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร

Time (hr.)	DCW (g/L)	P(3HB) conc. (g/l)	specific activity β -ketothiolase (U/mg protein)	specific activity citrate synthase (U/mg protein)
0	0.07±0.00	0.00±0.5	0.0121±0.000	0.3514±0.0000
3	0.71±0.02	0.01±0.06	1.0088±0.0007	0.4124±0.0150
6	3.71±0.11	0.64±0.02	0.1262±0.0001	1.9264±0.0510
9	10.32±0.62	2.33±0.09	0.0615±0.0009	2.0775±0.0440
12	26.20±0.40	6.36±0.2	0.0575±0.0005	1.8489±0.0270
15	28.40±0.25	5.32±0.02	0.0537±0.0001	1.7339±0.0110
18	26.88±0.39	4.04±0.02	0.0261±0.0001	1.6726±0.0919
21	25.59±0.96	3.10±0.05	0.0043±0.0000	1.6867±0.0380
24	18.66±1.58	1.14±0.09	0.0019±0.0000	1.4352±0.0150

หมายเหตุ: ±SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

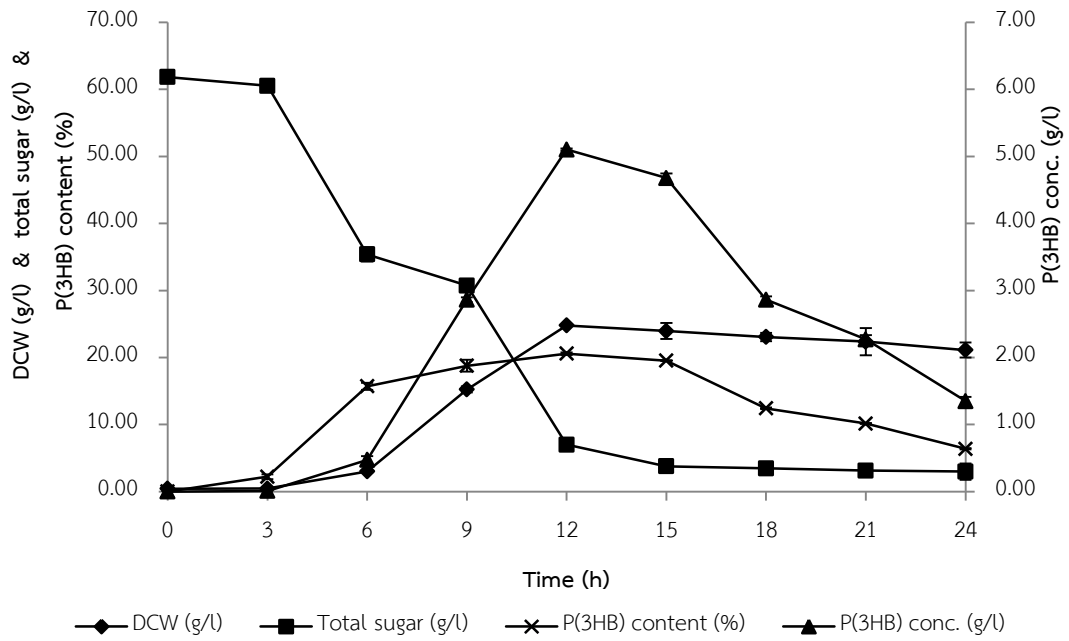


รูปที่ 36 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 32 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้น เท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) Content (% by wt.)
0	0.44±0.01	61.84±0.42	0.00±0.00	0.00±0.00
3	0.45±0.08	60.53±0.35	0.01±0.02	2.24±0.36
6	3.02±0.14	35.39±1.05	0.47±0.06	15.71±0.52
9	15.24±0.46	30.73±0.32	2.86±0.04	18.78±0.89
12	24.78±0.02	7.00±0.35	5.10±0.02	20.59±0.20
15	23.95±1.20	3.78±0.03	4.68±0.07	19.53±0.02
18	23.06±0.62	3.46±0.12	2.86±0.05	12.41±0.12
21	22.38±2.03	3.14±0.37	2.27±0.07	10.14±0.05
24	21.12±1.12	2.98±1.22	1.35±0.06	6.39±0.09

หมายเหตุ: ±SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

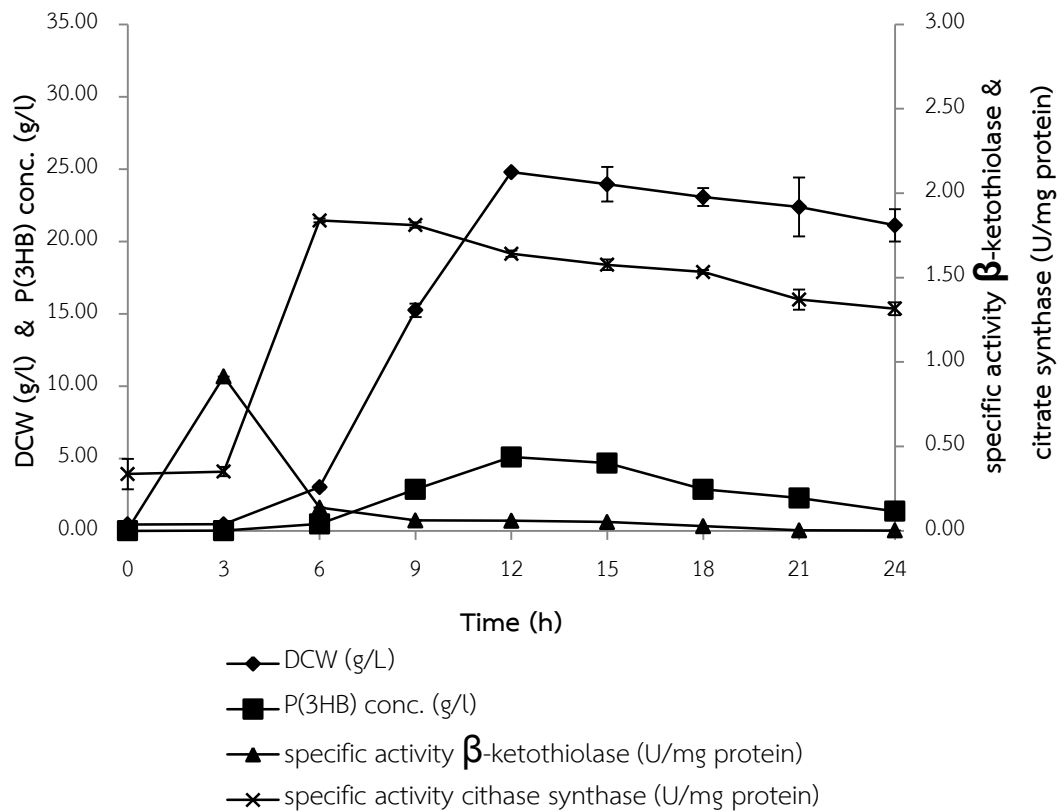


รูปที่ 37 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 33 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโกลเลส และแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร

Time (hr.)	DCW (g/L)	P(3HB) conc. (g/L)	specific activity β -ketothiolase (U/mg protein)	specific activity citrate synthase (U/mg protein)
0	0.44±0.01	0.00±0.00	0.0092±0.0008	0.3362±0.0904
3	0.45±0.08	0.01±0.02	0.9141±0.0000	0.3505±0.0277
6	3.02±0.14	0.47±0.06	0.1374±0.0001	1.8387±0.0106
9	15.24±0.46	2.86±0.04	0.0612±0.0004	1.8106±0.0159
12	24.78±0.02	5.1±0.02	0.0593±0.0007	1.6416±0.0185
15	23.95±1.20	4.68±0.07	0.0517±0.0006	1.5756±0.0315
18	23.06±0.62	2.86±0.05	0.0269±0.0009	1.5331±0.0116
21	22.38±2.03	2.27±0.07	0.0028±0.0008	1.3699±0.0592
24	21.12±1.12	1.35±0.06	0.0018±0.0001	1.3161±0.0378

หมายเหตุ: \pm SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

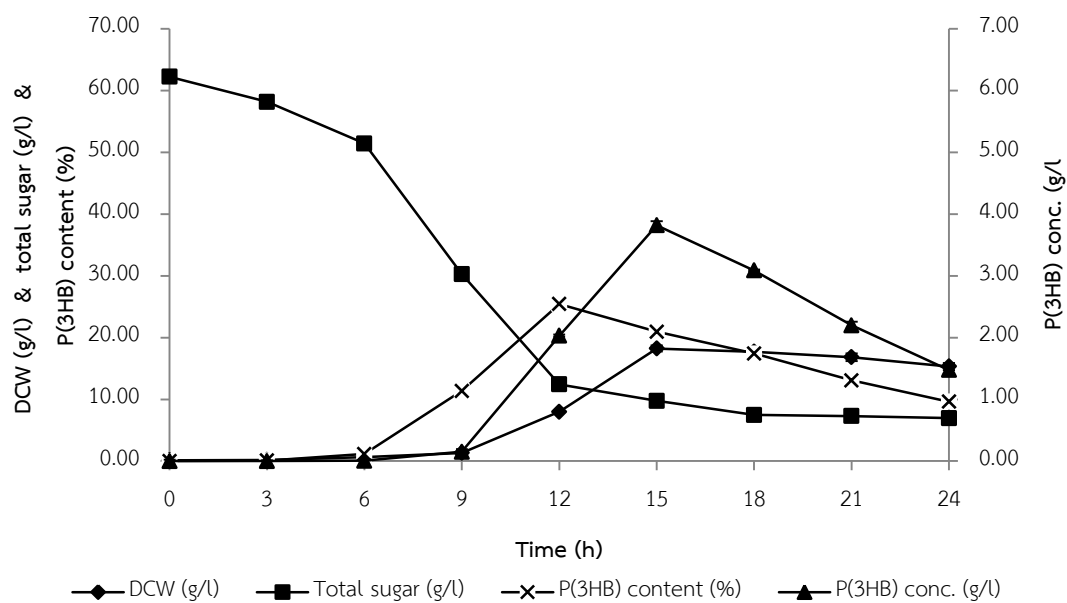


รูปที่ 38 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอเลส และแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 34 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้น เท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.15±0.03	62.23±0.59	0.00±0.00	0.00±0.00
3	0.19±0.05	58.17±0.59	0.00±0.02	0.10±0.03
6	0.64±0.00	51.41±0.70	0.01±0.01	1.16±0.25
9	1.32±0.09	30.26±0.35	0.15±0.05	11.36±0.19
12	7.99±0.11	12.42±0.35	2.03±0.02	25.42±0.19
15	18.24±0.48	9.76±0.03	3.82±0.07	20.94±0.01
18	17.72±0.36	7.47±0.03	3.09±0.02	17.43±0.11
21	16.82±0.64	7.29±0.35	2.20±0.06	13.08±0.04
24	15.32±0.57	6.95±0.49	1.47±0.06	9.63±0.06

หมายเหตุ: ±SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

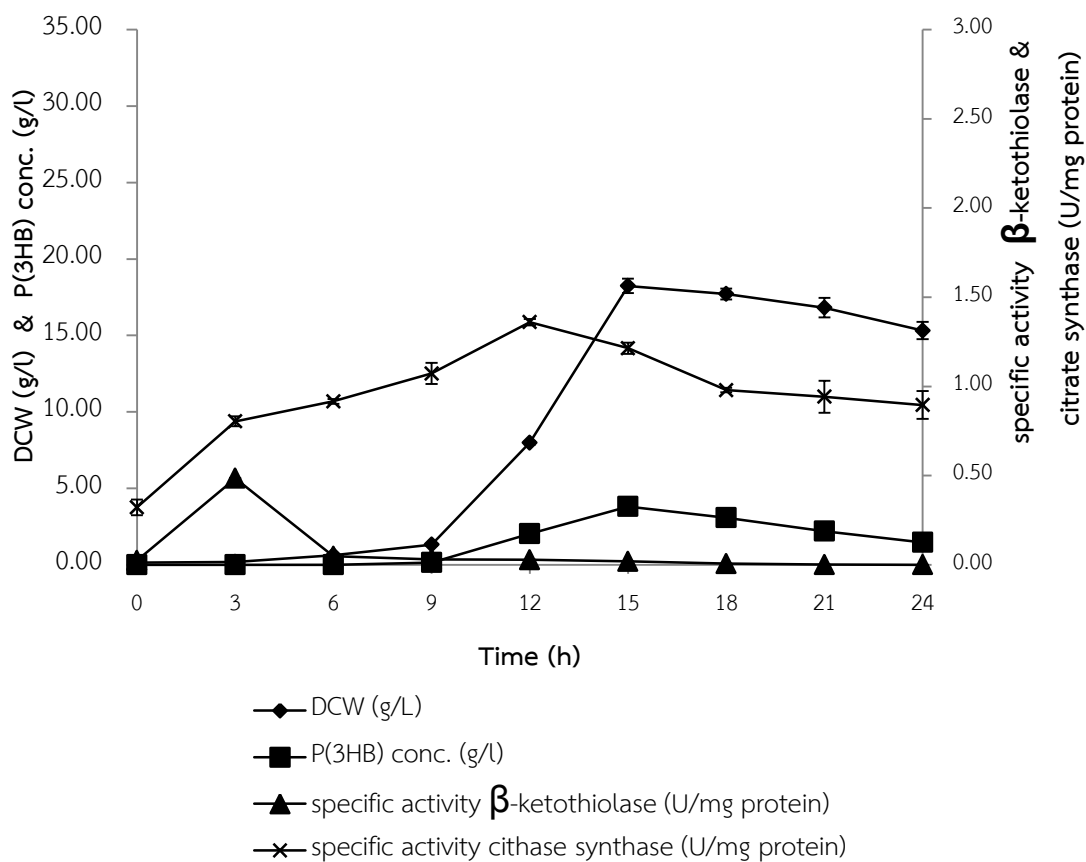


รูปที่ 39 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 35 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโกลเลส และแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร

Time (h)	DCW (g/L)	P(3HB) conc. (g/L)	specific activity β -ketothiolase (U/mg protein)	specific activity citrate synthase (U/mg protein)
0	0.15±0.03	0.00±0.00	0.0243±0.0008	0.3221±0.0440
3	0.19±0.05	0.00±0.02	0.4847±0.0009	0.8041±0.0277
6	0.64±0.00	0.01±0.01	0.0483±0.0001	0.9161±0.0136
9	1.32±0.09	0.15±0.05	0.0313±0.0004	1.0729±0.0592
12	7.99±0.11	2.03±0.02	0.0283±0.0007	1.3604±0.0179
15	18.24±0.48	3.82±0.07	0.0197±0.0001	1.2139±0.0315
18	17.72±0.36	3.09±0.02	0.0066±0.0009	0.9790±0.0126
21	16.82±0.64	2.20±0.06	0.0013±0.0000	0.9424±0.0892
24	15.32±0.57	1.47±0.06	0.0003±0.0001	0.8961±0.0780

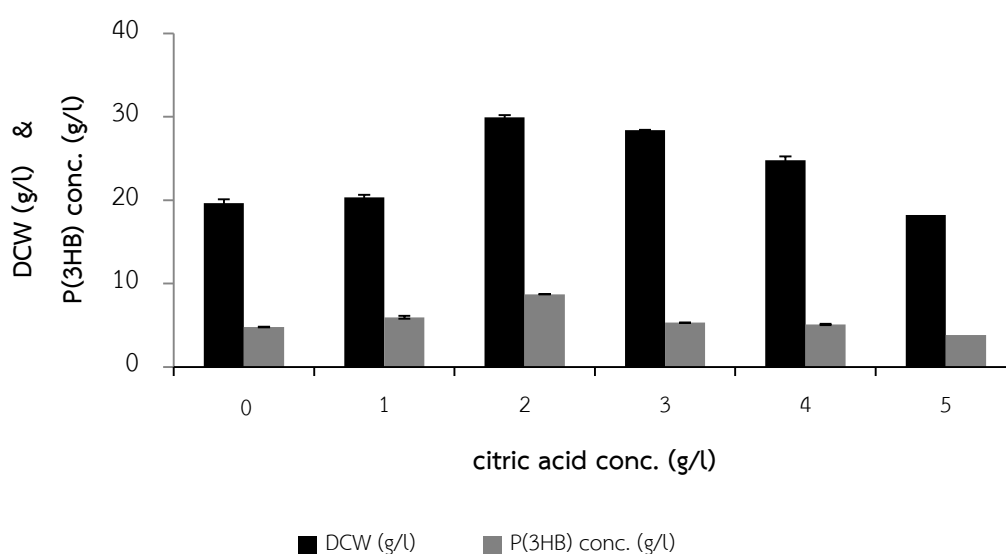
หมายเหตุ: ±SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ



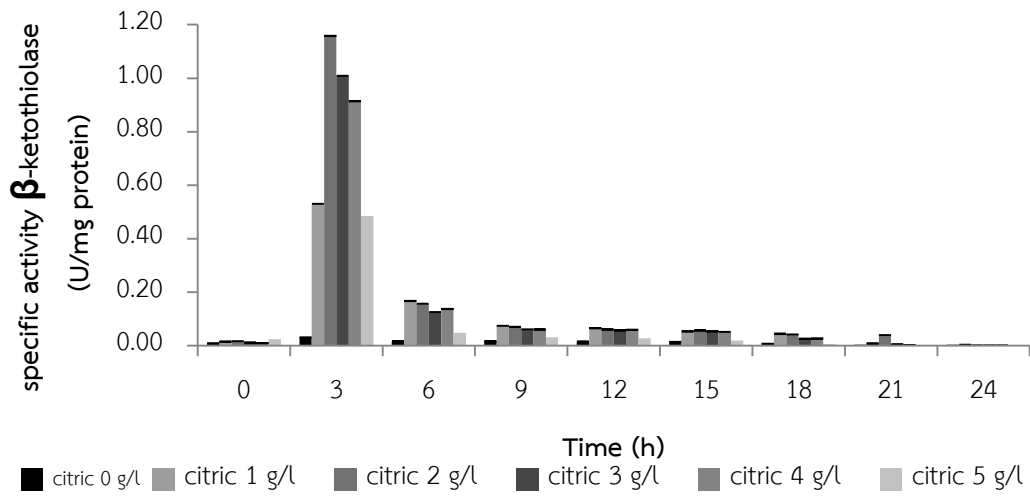
รูปที่ 40 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของบีต้า-คีโตไทโอส และแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 36 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 0 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

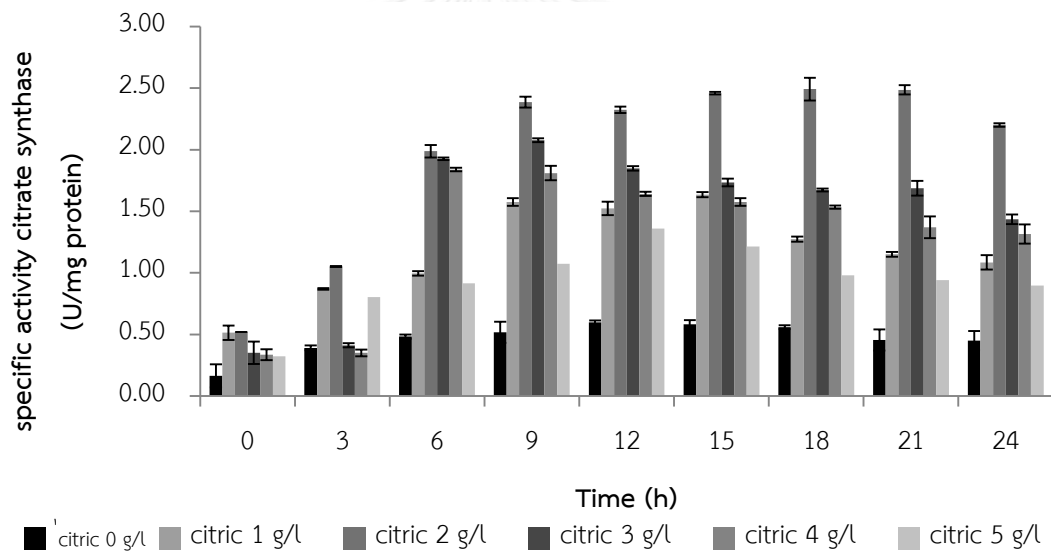
citric acid (g/L)	DCW (g/L)	P(3HB) conc. (g/L)
0	19.64±1.00	4.78±0.08
1	20.34±0.45	5.96±0.04
2	29.93±0.29	8.71±0.18
3	28.40±0.25	5.32±0.02
4	24.78±0.02	5.10±0.02
5	18.24±0.48	3.82±0.07



รูปที่ 41 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร และไม่เติมกรดซิตริก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



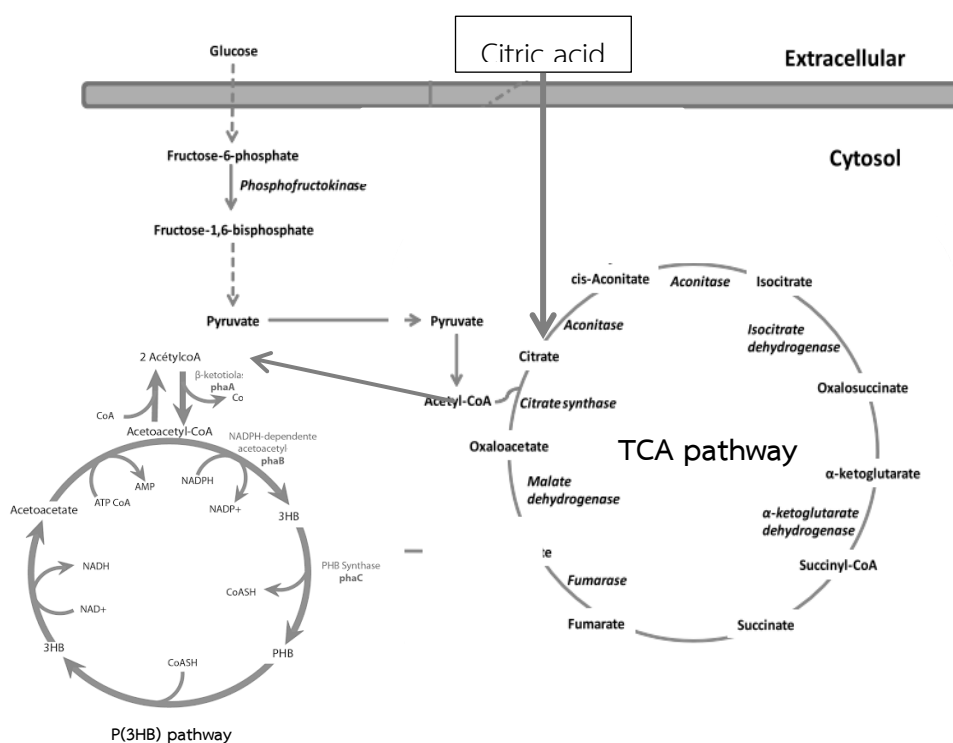
รูปที่ 42 เปรียบเทียบแอกติวิตีของบีต้า-คีโตไทโธเลส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 0 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019



รูปที่ 43 เปรียบเทียบแอกติวิตีของซิเตรท ซินเทส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 0 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ในภาวะการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารสมบูรณ์ จุลินทรีย์จะใช้แหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไปเป็นแอสิติล-โคเอ และเข้าสู่วิถี TCA โดยซิเตรท ซินเทสจะคะตะไลซ์แอสิติล-โคเอกับออกซาลอแอสิเตรท ไปเป็นซิเตรท และจะปล่อย CoASH อีสรออกมา CoASH อีสรนี้ จะทำหน้าที่ยับยั้งพีต้า-คีโตไทโอเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีชีวสังเคราะห์ P(3HB) ให้มีแอกติวิตีลดลงหรือไม่มีเลย ทำให้จุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารสมบูรณ์ไม่มีการผลิต P(3HB) ในทางตรงกันข้าม การเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดสมดุลของสารอาหาร เช่น การที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป แต่แหล่งไนโตรเจนถูกจำกัด แอสิติล-โคเอ จะเข้าสู่วิถีชีวสังเคราะห์ P(3HB) โดยการคะตะไลซ์ของพีต้า-คีโตไทโอเลส และปล่อย NADH มีผลยับยั้งการทำงานของซิเตรท ซินเทส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนอะเซทิล-โคเอไปเป็นซิเตรทในวิถี TCA เมื่อเอนไซม์ชนิดนี้ถูกยับยั้งจึงทำให้มีปริมาณอะเซทิล-โคเอเพิ่มมากขึ้นถึงระดับที่ทำให้ผลการยับยั้งของ CoASH อีสรต่อพีต้า-คีโตไทโอเลสหมดไป การสังเคราะห์ P(3HB) จึงเกิดขึ้นได้ (Griebel และคณะ, 1968; Pardelha และคณะ, 2012)

เนื่องจากการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดย *B. megaterium* BA-019 P(3HB) ถูกสะสมอยู่ในแกรนูลที่อยู่ภายในแต่ละเซลล์ หากมีปริมาณเซลล์เพิ่มมากขึ้น ก็ทำให้มีการสะสม P(3HB) ที่เพิ่มมากขึ้นด้วย จากการศึกษาพบว่า การเติมกรดซิตริกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้มีปริมาณเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่มีการเติมกรดซิตริก ซึ่งเป็นผลมาจากเมื่อเติมกรดซิตริกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จุลินทรีย์จะนำกรดซิตริกเข้าสู่วิถี TCA โดยไม่มีการปล่อย CoASH ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของออกซาลอแอสิเตรท กับแอสิติล-โคเอ จึงทำให้แอสิติล-โคเอ ถูกคะตะไลซ์โดยพีต้า-คีโตไทโอเลสเข้าสู่วิถีชีวสังเคราะห์ P(3HB) ดังแสดงในรูปที่ 44 ทำให้ *B. megaterium* BA-019 มีปริมาณเซลล์ และ P(3HB) ที่เพิ่มมากขึ้น แต่ในกรณีที่มีการเติมกรดซิตริกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยความเข้มข้นที่มากเกินไป กรดซิตริกทำให้มีการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์



รูปที่ 44 วิธี TCA และวิธีชีวสังเคราะห์ P(3HB) เมื่อมีการเติมกรดซิตริกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ปรับปรุงจาก Klement และ Buchs (2013))

Williamson และ Jones (1964) พบว่า ความเข้มข้นของกรดซิตริกที่มากเกินไป จะส่งผลให้เกิดการยับยั้งของฟอสโฟฟรุกโตไคเนส (phosphofruktokinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในวิถีไกลโคไลซิส โดยเปลี่ยนฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต (fructose-6-phosphate) ไปเป็นฟรุกโตส-1,2-บิสฟอสเฟต (fructose-1,2-bisphosphate) และปล่อยพลังงานออกมาในรูปของ ATP เพื่อไปใช้สำหรับการเจริญต่อไป ด้วยเหตุผลดังกล่าว จึงทำให้การเติมกรดซิตริกในปริมาณที่สูงกว่า 2 กรัมต่อลิตรมีผลทำให้มีปริมาณเซลล์และปริมาณ P(3HB) ที่น้อยกว่าการเติมกรดซิตริกเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร

4.4 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) แอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส และปีต้า-คีโตไทโอเลส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 60% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน และเติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อและไม่ได้เติมกรดซิตริก

จากผลการศึกษาพบว่าภาวะที่ทำให้เชื้อ *B. megaterium* BA-019 สามารถเจริญและสังเคราะห์ P(3HB) ได้ดีที่สุดคือ การเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MSM ที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 60% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน และมีการเติมกรดซิตริกที่มีความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ด้วยภาวะการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 29.93 ± 0.29 และ 8.71 ± 0.18 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงเชื้อในอาหารชนิดเดียวกันแต่ไม่ได้ควบคุมปัจจัยทั้งสองดังกล่าว (ตารางที่ 37 และ 38) พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นประมาณ 1.6 เท่า (18.36 ± 0.38 กรัมต่อลิตร) และมีความเข้มข้นของ P(3HB) เพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า (4.09 ± 0.08 กรัมต่อลิตร)

เมื่อพิจารณาแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทส และปีต้า-คีโตไทโอเลส พบว่าแอคติวิตีของซิเตรท ซินเทสและปีต้า-คีโตไทโอเลส เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับแอคติวิตีของเอนไซม์ในภาวะที่ไม่ได้ควบคุมปัจจัยทั้งสองดังกล่าว โดยซิเตรท ซินเทสมีแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 2.4923 ± 0.061 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 4.6 เท่า (0.5396 ± 0.0511 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) และแอคติวิตีสูงสุดของปีต้า-คีโตไทโอเลสเท่ากับ 1.1584 ± 0.0002 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 38 เท่า (0.5396 ± 0.0511 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)

ตารางที่ 37 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 60% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน และเติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อและไม่ได้เติมกรดซิตริก

Time (h)	DO : not control Citric acid = 0 g/l		DO = 60% satd. citric acid = 2 g/l	
	DCW (g/L)	P(3HB) conc. (g/l)	DCW (g/L)	P(3HB) conc. (g/l)
	0	0.02±0.06	0.00±0.00	0.40±0.14
3	0.07±0.04	0.00±0.08	0.94±0.03	0.02±0.07
6	3.11±0.17	0.44±0.01	3.19±0.14	0.60±0.03
9	9.44±0.36	2.01±0.09	10.73±0.11	2.90±0.02
12	16.80±0.80	4.00±0.18	29.93±0.29	8.71±0.18
15	18.36±0.38	4.09±0.08	29.89±1.29	7.09±0.02
18	18.15±0.81	3.66±0.08	27.10±0.45	6.45±0.02
21	18.08±0.78	3.65±0.01	25.08±0.31	5.74±0.05
24	17.10±0.65	2.68±0.02	23.10±0.53	5.16±0.10

หมายเหตุ: ±SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 38 เปรียบเทียบแอกติวิตีของซิติเรท ซินเทส และบีต้า-คีโตไทโอเลส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 60% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน และเติมกรดซิตริกความเข้มข้นเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อและไม่ได้เติมกรดซิตริก

Time (h)	DO : not control Citric acid = 0 g/l		DO = 60% satd. citric acid = 2 g/l	
	specific activity β -ketothiolase (U/mg protein)	specific activity citrate synthase (U/mg protein)	specific activity β -ketothiolase (U/mg protein)	specific activity citrate synthase (U/mg protein)
0	0.0071±0.0003	0.1564±0.0474	0.0172±0.0008	0.5191±0.0994
3	0.0300±0.0007	0.3610±0.0123	1.1584±0.0002	1.0517±0.0270
6	0.0178±0.0001	0.4834±0.0346	0.157±0.0005	1.9881±0.0181
9	0.0155±0.0004	0.5007±0.0655	0.0702±0.0004	2.3854±0.0819
12	0.0148±0.0007	0.5090±0.0015	0.0606±0.0003	2.3239±0.0850
15	0.0145±0.0000	0.5282±0.0098	0.0574±0.0001	2.4595±0.0510
18	0.0061±0.0002	0.5396±0.0511	0.0427±0.0009	2.4923±0.0610
21	0.0009±0.0000	0.4354±0.0619	0.0397±0.0004	2.4861±0.0190
24	0.0006±0.0000	0.4391±0.0810	0.0020±0.0002	2.2009±0.0580

หมายเหตุ: \pm SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมบางประการ คือ ชนิดของแหล่งคาร์บอน ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ และความเข้มข้นของกรดซิตริกที่เติมลงในอาหารสำหรับการผลิต P(3HB) เพื่อควบคุมวิถีชีวสังเคราะห์ใน *B. megaterium* BA-019 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มผลผลิตของ P(3HB) โดยการตรวจวัดแอกติวิตีของเบต้า-คีโตไฮโอเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีการสังเคราะห์ P(3HB) และซิเตรท ซินเทส ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถี TCA โดยเปรียบเทียบกับปริมาณเซลล์และปริมาณ P(3HB) ที่ผลิต ซึ่งอาจนำไปสู่การปรับปรุงกระบวนการผลิตให้ได้ P(3HB) ปริมาณมากขึ้น

จากผลการศึกษาการผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 พบว่าการเจริญของเซลล์มีความสัมพันธ์กับการผลิต P(3HB) กล่าวคือ จุลินทรีย์มีการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ในระหว่างการเจริญ (growth-associated product formation) และจากผลการศึกษาพบว่ากากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำให้ *B. megaterium* BA-019 เจริญและผลิต P(3HB) ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับน้ำตาลทราย โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุดคือ 20.87 ± 0.06 และ 5.82 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าเมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากันประมาณ 20 เท่า ซึ่งเป็นผลมาจากองค์ประกอบของกากน้ำตาลประกอบด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์อยู่หลายชนิด เช่น น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรักโตส รวมทั้งวิตามินและแร่ธาตุอาหารสำคัญต่อระบบเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ จึงทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญและปริมาณ P(3HB) ที่มีเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ประเทศไทยยังมีการปลูกอ้อยและมีโรงงานผลิตน้ำตาลจากอ้อยเป็นจำนวนมาก กากน้ำตาลที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจึงมีปริมาณมาก หาง่าย และราคาถูก สามารถนำมาเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิต P(3HB) ได้

สำหรับปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ที่ใช้ในการผลิต P(3HB) คือ 60% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน ซึ่งทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 24.39 ± 0.06 และ 6.99 ± 0.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับที่ 15 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และมีแอกติวิตีของเอนไซม์ซิเตรท ซินเทส และเบต้า-คีโตไฮโอเลสเท่ากับ 0.6007 ± 0.0042 และ 0.0408 ± 0.0019 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ที่เวลา 12 และ 3 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าแอกติวิตีของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในภาวะที่มีปริมาณ

ออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20 40 และ 80% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน เนื่องจาก *B. megaterium* BA-019 เป็นจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการออกซิเจนสำหรับการเจริญ จึงจำเป็นต้องใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย เมื่อมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าที่เหมาะสมจึงทำให้ *B. megaterium* BA-019 มีการเจริญและการสังเคราะห์ P(3HB) ที่สูงขึ้น แต่หากมีปริมาณออกซิเจนที่มากเกินไป (ในภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 80% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน) จะมีการสะสมของสารพิษในกลุ่มของ reactive oxygen species (ROS) เช่น superoxide (O_2^-) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) (Baez and Shiloach, 2014) มีผลการยับยั้ง energy-linked pyridine nucleotide ในไมโทคอนเดรีย และมีผลต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันของหมู่ซัลไฟดิล (sulphydryl groups) (Barron, 1955; Chance และคณะ, 1965) นอกจากนี้ความเร็วรอบของใบกวนที่สูงเกินไปอาจทำให้เกิดแรงเฉือน (shear stress) ที่มากส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียถูกทำลาย

นอกจากนี้การเติมกรดซिटริกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ทำให้ *B. megaterium* BA-019 มีการเจริญและผลิต P(3HB) ในปริมาณที่สูงกว่าความเข้มข้นอื่นๆ กล่าวคือ ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 29.93 ± 0.29 และ 8.48 ± 0.35 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อตามลำดับ และทำให้ซิเตรท ซินเทส และปีต้า-คีโตไทโอเลส มีแอกติวิตีสูงกว่าการเติมกรดซिटริกที่ความเข้มข้นอื่นๆ โดยแอกติวิตีของซิเตรท ซินเทสสูงสุดเท่ากับ 2.4923 ± 0.061 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน และแอกติวิตีของปีต้า-คีโตไทโอเลสสูงสุดเท่ากับ 1.1584 ± 0.0002 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน เนื่องมาจากเมื่อเติมกรดซिटริกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จุลินทรีย์จะนำกรดซिटริกเข้าสู่วิถี TCA โดยที่ไม่ต้องใช้ซิเตรท ซินเทสเข้าทำปฏิกิริยากับแอกซิทิล-โคเอ จึงทำให้แอกซิทิล-โคเอ ถูกคะตะไลซ์โดยปีต้า-คีโตไทโอเลสเข้าสู่วิถีชีวสังเคราะห์ P(3HB) ทำให้ *B. megaterium* BA-019 มีปริมาณเซลล์ และ P(3HB) ที่เพิ่มมากขึ้น แต่ในกรณีที่มีการเติมกรดซिटริกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยความเข้มข้นที่มากเกินไป กรดซिटริกทำให้มีการยับยั้งเอนไซม์ที่สำคัญในวิถีไกลโคไลซิส ทำให้วิถีดำเนินไปอย่างไม่ปกติ จึงทำให้เซลล์ในปริมาณที่น้อยกว่าการเติมกรดซिटริกในความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 2 กรัมต่อลิตร

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่ผลิต P(3HB) โดยการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมซึ่งเท่ากับ 60% ของค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน และมีการเติมกรดซिटริกที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารสำหรับผลิต P(3HB) (MSM) ซึ่ง *B. megaterium* BA-019 สามารถเจริญและผลิต P(3HB) ได้ในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารที่ไม่ได้ควบคุมปัจจัยทั้งสองดังกล่าว ดังแสดงในตารางที่ 37 อย่างไรก็ตามการควบคุมวิถี TCA และวิถีชีวสังเคราะห์ P(3HB) สามารถทำได้อีกหลายวิธี ดังนั้นใน

อนาคตอาจต้องมีการศึกษาการควบคุมควมวิถีชีวสังเคราะห์ P(3HB) ด้วยวิธีอื่นๆ เช่น การศึกษาการเติมสารมัธยันตร์ที่เกี่ยวข้องกับวิถี TCA ลงในอาหารสำหรับการผลิต P(3HB) เนื่องจากสารมัธยันตร์บางชนิดสามารถเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ที่สำคัญในวิถีชีวสังเคราะห์ P(3HB) (Hao และคณะ, 2012) การปรับปรุงสายพันธุ์ *B. megaterium* BA-019 ด้วยวิธีพันธุวิศวกรรม ให้มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์สำคัญในวิถีชีวสังเคราะห์ P(3HB) เพื่อควบคุมให้เชื้อสามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) เพิ่มมากขึ้น (Keith และคณะ, 2010) หรือการศึกษาหาวิธีที่สามารถทำให้แอกซิฟิล-โคเอ ซึ่งอยู่ภายในไมโทคอนเดรียออกสู่บริเวณไซโตซอล เนื่องจากวิถีชีวสังเคราะห์ P(3HB) เกิดอยู่บริเวณไซโทซอลของจุลินทรีย์ ดังแสดงในรูปที่ 44 ข้อได้เปรียบของงานวิจัยนี้คือ การใช้แหล่งคาร์บอน ได้แก่ กากน้ำตาล แหล่งไนโตรเจนคือ ยูเรีย และการเลือกใช้สารมัธยันตร์ในวิถี TCA คือ กรดซิตริก ซึ่งล้วนมีราคาถูก รวมไปถึงการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงทำให้เชื้อเจริญและสังเคราะห์ P(3HB) ได้มากขึ้น นอกจากนี้เชื้อ *B. megaterium* BA-019 มีการเจริญที่เร็ว อีกทั้งมีการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ไปพร้อมๆ กับการเจริญ ซึ่งจัดเป็นการลดต้นทุนในด้านของราคาวัตถุดิบ ระยะเวลา และพลังงานที่ใช้ในการผลิต จึงช่วยทำให้การผลิต (P3HB) มีราคาต้นทุนการผลิตต่ำลงได้

รายการอ้างอิง

- Aldor, I. S. and J. D. Keasling (2003). "Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates." Curr Opin Biotechnol **14**(5): 475-483.
- Asada, Y., M. Miyake, J. Miyake, R. Kurane and Y. Tokiwa (1999). "Photosynthetic accumulation of poly-(hydroxybutyrate) by cyanobacteria--the metabolism and potential for CO₂ recycling." Int J Biol Macromol **25**(1-3): 37-42.
- Balaji, S., K. Gopi and B. Muthuvelan (2013). "A review on production of poly β hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics." Algal Research **2**(3): 278-285.
- Barron, E. S. G. (1955). "Oxidation of some oxidation-reduction systems by oxygen at high pressures." Arch Biochem Biophys **59**(2): 502-510.
- Bond, D. R., T. Mester, C. L. Nesbo, A. V. Izquierdo-Lopez, F. L. Collart and D. R. Lovley (2005). "Characterization of citrate synthase from *Geobacter sulfurreducens* and evidence for a family of citrate synthases similar to those of eukaryotes throughout the Geobacteraceae." Appl Environ Microbiol **71**(7): 3858-3865.
- Bouallagui, H., Y. Touhami, N. Hanafi, A. Ghariani and M. Hamdi (2013). "Performances comparison between three technologies for continuous ethanol production from molasses." Biomass and Bioenergy **48**(0): 25-32.
- Brandl, H., R. A. Gross, R. W. Lenz and R. C. Fuller (1990). "Plastics from bacteria and for bacteria: poly(beta-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters." Adv Biochem Eng Biotechnol **41**: 77-93.
- Chance, B., D. Jamieson and H. Coles (1965). "Energy-linked pyridine nucleotide reduction: inhibitory effects of hyperbaric oxygen in vitro and in vivo." Nature **206**(981): 257-263.
- Chanprateep, S. (2010). "Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates." J Biosci Bioeng **110**(6): 621-632.

- Chen, G. Q., K. H. König and R. M. Lafferty (1991). "Production of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate and poly-D(-)-3-hydroxyvalerate by strains of *Alcaligenes latus*." Antonie van Leeuwenhoek **60**(1): 61-66.
- Chiellini, E., P. Cinelli, V. I. Ilieva and M. Martera (2008). "Biodegradable thermoplastic composites based on polyvinyl alcohol and algae." Biomacromolecules **9**(3): 1007-1013.
- Cleland, W. W. (1964). "Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups." Biochemistry **3**: 480-482.
- Comeau, Y., K. J. Hall and W. K. Oldham (1988). "Determination of Poly-beta-Hydroxybutyrate and Poly-beta-Hydroxyvalerate in Activated Sludge by Gas-Liquid Chromatography." Appl Environ Microbiol **54**(9): 2325-2327.
- Daidone, I., D. Roccatano and S. Hayward (2004). "Investigating the accessibility of the closed domain conformation of citrate synthase using essential dynamics sampling." J Mol Biol **339**(3): 515-525.
- Doi, Y. (1990). Microbial polyesters. New York.
- Doi, Y., Y. Kawaguchi, N. Koyama, S. Nakamura, M. Hiramitsu, Y. Yoshida and H. Kimura (1992). "Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*." FEMS Microbiol Lett **103**(2-4): 103-108.
- Doi, Y., Y. Kawaguchi, Y. Nakamura and M. Kunioka (1989). "Nuclear Magnetic Resonance Studies of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Polyphosphate Metabolism in *Alcaligenes eutrophus*." Appl Environ Microbiol **55**(11): 2932-2938.
- DuBois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith (1956). "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances." Analytical Chemistry **28**(3): 350-356.
- Ellman, G. L. (1959). "Tissue sulfhydryl groups." Arch Biochem Biophys **82**(1): 70-77.
- Evans, J. D. and S. K. Sikdar (1990). "Biodegradable plastics: an idea whose time has come?" Chemical Technology **20**(1): 38-42.
- Griebel, R., Z. Smith and J. M. Merrick (1968). "Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate. I. Purification, composition, and properties of native poly-beta-hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*." Biochemistry **7**(10): 3676-3681.

- Hao, S., Z. Yingxin, K. Weibao and X. Chungu (2012). "Activities of Key Enzymes in the Biosynthesis of Poly-3-Hydroxybutyrate by *Methylosinus trichosporium* IMV3011." Chin. J. Catal. **33**: 1754–1761.
- Harrison, D. E. and S. J. Pirt (1967). "The influence of dissolved oxygen concentration on the respiration and glucose metabolism of *Klebsiella aerogenes* during growth." J Gen Microbiol **46**(2): 193-211.
- Harvey, R. A., R. A. Harvey and D. R. Ferrier (2011). Biochemistry, Wolters Kluwer Health.
- Haywood, G. W., A. J. Anderson, D. R. Williams, E. A. Dawes and D. F. Ewing (1991). "Accumulation of a poly(hydroxyalkanoate) copolymer containing primarily 3-hydroxyvalerate from simple carbohydrate substrates by *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126." Int J Biol Macromol **13**(2): 83-88.
- Henderson, R. A. and C. W. Jones (1997). "Poly-3-hydroxybutyrate production by washed cells of *Alcaligenes eutrophus*; purification, characterisation and potential regulatory role of citrate synthase." Arch Microbiol **168**(6): 486-492.
- Huisman, G. W., E. Wonink, R. Meima, B. Kazemier, P. Terpstra and B. Witholt (1991). "Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*. Identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA." J Biol Chem **266**(4): 2191-2198.
- Jari, M., S. R. Khatami, H. Galehdari and M. Shafiei (2015). "Cloning and Expression of Poly 3-Hydroxybutyrate Operon Into *Escherichia coli*." Jundishapur J Microbiol **8**(2): e16318.
- Jo, S. J., M. Maeda, T. Ooi and S. Taguchi (2006). "Production system for biodegradable polyester polyhydroxybutyrate by *Corynebacterium glutamicum*." J Biosci Bioeng **102**(3): 233-236.
- Johnson, D. E. and R. S. Hanson (1974). "Bacterial citrate synthases: purification, molecular weight and kinetic mechanism." Biochim Biophys Acta **350**(2): 336-353.
- Kannan, L. V. and Z. Rehacek (1970). "Formation of poly-beta-hydroxybutyrate by Actinomycetes." Indian J Biochem **7**(2): 126-129.

- Keevil, C. W., M. I. Williamson, P. D. Marsh and D. C. Ellwood (1984). "Evidence that glucose and sucrose uptake in oral streptococcal bacteria involves independent phosphotransferase and proton-motive force-mediated mechanisms." Arch Oral Biol **29**(11): 871-878.
- Kessler, B. and B. Witholt (2001). "Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism." J Biotechnol **86**(2): 97-104.
- Klement, T. and J. Buchs (2013). "Itaconic acid—a biotechnological process in change." Bioresour Technol **135**: 422-431.
- Kulpeechea, S. (2006). Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Production, optimization and factors affecting PHA accumulation. the International Conference and Exhibition on Bioplastics, Siam Paragon, Bangkok, Thailand.
- Kulpreecha, S., A. Boonruangthavorn, B. Meksiriporn and N. Thongchul (2009). "Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*." J Biosci Bioeng **107**(3): 240-245.
- Labuzek, S. and I. Radecka (2001). "Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85." J Appl Microbiol **90**(3): 353-357.
- Lee, S. Y. (1996). "Bacterial polyhydroxyalkanoates." Biotechnol Bioeng **49**(1): 1-14.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson and M. M. Cox (2005). Lehninger Principles of Biochemistry, W. H. Freeman.
- Lemoigne, M. (1926). "production dehydration and polymerization of β -hydroxybutyric." Bull.Soc.Chem.Biol **8**: 770-782.
- Lenz, R. W. and R. H. Marchessault (2005). "Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology." Biomacromolecules **6**(1): 1-8.
- Liebergesell, M. and A. Steinbuchel (1992). "Cloning and nucleotide sequences of genes relevant for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid) in *Chromatium vinosum* strain D." Eur J Biochem **209**(1): 135-150.
- Loo, C. Y. and K. Sudesh (2007). "Biosynthesis and native granule characteristics of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in *Delftia acidovorans*." Int J Biol Macromol **40**(5): 466-471.
- López, J. A., J. M. Naranjo, J. C. Higueta, M. A. Cubitto, C. A. Cardona and M. A. Villar (2012). "Biosynthesis of PHB from a New Isolated *Bacillus megaterium* Strain:

- Outlook on Future Developments with Endospore Forming Bacteria." Biotechnol Bioeng **17**: 250-258.
- Luengo, J. M., B. Garcia, A. Sandoval, G. Naharro and E. R. Olivera (2003). "Bioplastics from microorganisms." Curr Opin Microbiol **6**(3): 251-260.
- Lukesh, J. C., 3rd, M. J. Palte and R. T. Raines (2012). "A potent, versatile disulfide-reducing agent from aspartic acid." J Am Chem Soc **134**(9): 4057-4059.
- McCool, G. J. and M. C. Cannon (2001). "PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*." J Bacteriol **183**(14): 4235-4243.
- Merilainen, G., V. Poikela, P. Kursula and R. K. Wierenga (2009). "The thiolase reaction mechanism: the importance of Asn316 and His348 for stabilizing the enolate intermediate of the Claisen condensation." Biochemistry **48**(46): 11011-11025.
- Moore, B. and R. S. Williams (1911). "The Growth of Various Species of Bacteria and Other Micro-Organisms in Atmospheres Enriched with Oxygen." Biochem J **5**(4): 181-187.
- Naranjo, J. M., J. A. Posada, J. C. Higueta and C. A. Cardona (2013). "Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*." Bioresource Technology **133**(0): 38-44.
- Nascimento, J. F., W. M. Pachekoski and J. R. De Lello Vicino (2007). Composition for preparing a degradable polyol polyester, process for obtaining a polyol polyester, an elastomer, foams, paints and adhesives, and a degradable polyol polyester foam, Google Patents.
- Nelson, D. L. and M. M. Cox (2013). Lehninger Principles of Biochemistry, W.H. Freeman.
- Ojumu, T. V., J. Yu and B. O. Solomon (2003). "Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer." Afr J Biotechnol **3**(1).
- Pardelha, F., M. G. Albuquerque, M. A. Reis, J. M. Dias and R. Oliveira (2012). "Flux balance analysis of mixed microbial cultures: application to the production of polyhydroxyalkanoates from complex mixtures of volatile fatty acids." J Biotechnol **162**(2-3): 336-345.

- Petersen, D. J. and G. N. Bennett (1991). "Cloning of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 acetyl coenzyme A acetyltransferase (thiolase; EC 2.3.1.9) gene." Appl Environ Microbiol **57**(9): 2735-2741.
- Pries, A., H. Priefert, N. Kruger and A. Steinbuchel (1991). "Identification and characterization of two *Alcaligenes eutrophus* gene loci relevant to the poly(beta-hydroxybutyric acid)-leaky phenotype which exhibit homology to ptsH and ptsI of *Escherichia coli*." J Bacteriol **173**(18): 5843-5853.
- Reddy, C. S., R. Ghai, Rashmi and V. C. Kalia (2003). "Polyhydroxyalkanoates: an overview." Bioresour Technol **87**(2): 137-146.
- Rehm, B. H. (2003). "Polyester synthases: natural catalysts for plastics." Biochem J **376**(Pt 1): 15-33.
- Remington, S., G. Wiegand and R. Huber (1982). "Crystallographic refinement and atomic models of two different forms of citrate synthase at 2.7 and 1.7 Å resolution." J Mol Biol **158**(1): 111-152.
- Ren, N., J. Li, B. Li, Y. Wang and S. Liu (2006). "Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system." International J Hydro Ener **31**(15): 2147-2157.
- Reusch, R. N. (2013). "The role of short-chain conjugated poly-(R)-3-hydroxybutyrate (cPHB) in protein folding." Int J Mol Sci **14**(6): 10727-10748.
- Riddles, P. W., R. L. Blakeley and B. Zerner (1983). "Reassessment of Ellman's reagent." Methods Enzymol **91**: 49-60.
- Riener, C. K., G. Kada and H. J. Gruber (2002). "Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine." Anal Bioanal Chem **373**(4-5): 266-276.
- Senior, P. J. and E. A. Dawes (1971). "The role and regulation of poly-beta-hydroxybutyrate synthesis in *Azotobacter beijerinckii*." Biochem J **123**(4): 29P.
- Singh, M., S. K. Patel and V. C. Kalia (2009). "*Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates." Microbial Cell Factories **8**(38): 1-11.
- Steinbuchel, A. and B. Fuchtenbusch (1998). "Bacterial and other biological systems for polyester production." Trends Biotechnol **16**(10): 419-427.

- Stim-Herndon, K. P., D. J. Petersen and G. N. Bennett (1995). "Characterization of an acetyl-CoA C-acetyltransferase (thiolase) gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." Gene **154**(1): 81-85.
- Sudesh, K., C. Y. Loo, L. K. Goh, T. Iwata and M. Maeda (2007). "The oil-absorbing property of polyhydroxyalkanoate films and its practical application: a refreshing new outlook for an old degrading material." Macromol Biosci **7**(11): 1199-1205.
- Timm, A. and A. Steinbuchel (1992). "Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." Eur J Biochem **209**(1): 15-30.
- Valentin, H. E. and D. Dennis (1996). "Application of an optimized electroporation procedure for replacement of the polyhydroxyalkanoate synthase I gene in *Nocardia corallina*." Can J Microbiol **42**(7): 715-719.
- Voet, D., J. G. Voet and C. W. Pratt (2008). Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level, John Wiley & Sons, Incorporated.
- Volova, T. G., G. S. Kalacheva, O. V. Gorbunova and N. O. Zhila (2004). "[Dynamics of activity of the key enzymes of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Ralstonia eutropha*." Prikl Biokhim Mikrobiol **40**(2): 201-209.
- Weitzman, P. D. (1981). "Unity and diversity in some bacterial citric acid-cycle enzymes." Adv Microb Physiol **22**: 185-244.
- Weitzman, P. D. and M. J. Danson (1976). "Citrate synthase." Curr Top Cell Regul **10**: 161-204.
- Wiesenborn, D. P., F. B. Rudolph and E. T. Papoutsakis (1988). "Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Its Role in the Synthesis of Acids and Solvents." Appl Environ Microbiol **54**(11): 2717-2722.
- Williamson, J. R. and E. A. Jones (1964). "Inhibition of Glycolysis by Pyruvate in Relation to the Accumulation of Citric Acid Cycle Intermediates in the Perfused Rat Heart." Nature **203**(4950): 1171-1173.
- Wright, A. G., T. P. Ellis and L. L. Ilag (2014). "Filtered molasses concentrate from sugar cane: natural functional ingredient effective in lowering the glycaemic index

- and insulin response of high carbohydrate foods." *Plant Foods Hum Nutr* **69**(4): 310-316.
- Wu, G., A. J. Moir, G. Sawers, S. Hill and R. K. Poole (2001). "Biosynthesis of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) is controlled by *CydR* (*Fnr*) in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii*." *FEMS Microbiol Lett* **194**(2): 215-220.
- กุสุมา กมลจรัสโสภาน. (2547). การผลิตกรดอาร์(-)-ไฮดรอกซีบิวไทริกโดยการดีพอลิเมอไรเซชันในเซลล์ของ *Bacillus* sp BA-019. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บุญฤทธิ เมฆศิริพร. (2551). การขยายส่วนการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต โดย *Bacillus megaterium* BA-019. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปวุด กาญจนชุมพล. (2553). การขยายส่วนการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)ในเฟด-แบตช์ โดย *Bacillus megaterium* BA-019. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รัตน์ศิริ มุฑิตากุล. (2538). การผลิตพอลิปีต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ที่แยกได้. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สงศรี กุลปรีชา. (2536). การผลิตพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้โดยธรรมชาติจากจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุขฤทัย พันศิริพนธ์. (2556). การพัฒนากระบวนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ซึ่งผลิตจาก *Bacillus megaterium* BA-019. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุดา สุภาวสินสวัสดิ์. (2542). ผลของซัสเตรทต่อสัดส่วนของ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตใน พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ซึ่งผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อดิพล บุญเรืองถาวร. (2543). การผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) โดยการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 แบบป้อนเป็นงวดภายใต้การจำกัดปริมาณไนโตรเจน. วิทยานิพนธ์ปริญญา

มหาบัณฑิต, สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

การเตรียมวัตถุดิบและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำตาล

1.1 สารละลายฟีนอล 5% น้ำหนักต่อปริมาตร

ละลายฟีนอลปริมาณ 25 กรัมด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ P(3HB)

2.1 สารละลาย acidified methanol 3% น้ำหนักต่อปริมาตร

ละลายกรดเบนโซอิกปริมาณ 1 กรัมด้วยเมทานอลจนกรดเบนโซอิกละลาย เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 17.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยเมทานอล

3. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เอนไซม์

3.1 สารละลายบัฟเฟอร์ 1 M Tris-HCl, pH 8.0 stock solution

ละลาย Tris(hydroxymethyl)aminomethane ปริมาณ 121.1 กรัมด้วยน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย 0.1 M HCl ให้ได้ 8.0 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ใช้ในแต่ละขั้นตอน

3.2 สารละลาย 1 M phosphate buffer saline (PBS) stock solution

ละลาย NaCl ปริมาณ 8 กรัม KCl ปริมาณ 200 มิลลิกรัม NaHPO_4 ปริมาณ 1.44 กรัม และ KH_2PO_4 ปริมาณ 240 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร เจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ใช้ในแต่ละขั้นตอน

3.3 สารละลาย 0.2 mM DTNB (5, 5'-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid)

ละลาย 5, 5'-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid ด้วย 0.1 M PBS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง และควรเตรียมใหม่ทุกๆ 30 วัน

3.4 สารละลาย 0.5 M DTT (dithiothreitol) stock solution

ละลาย dithiothreitol ปริมาณ 0.0771 กรัม ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดละ 500 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ใช้ในแต่ละขั้นตอน



ภาคผนวก ข

สูตรคำนวณ

1. การคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t}$$

$$Y_{P/X} = \frac{P_t - P_0}{X_t - X_0}$$

$$Y_{P/S} = \frac{P_t - P_0}{S_0 - S_t}$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t}$$

$$\text{productivity} = \frac{P_t - P_0}{t}$$

เมื่อ	μ	คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)
	$Y_{P/X}$	คือ ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อหนึ่งหน่วยเซลล์
	$Y_{P/S}$	คือ ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อซับสเตรทที่ใช้ไป
	$Y_{X/S}$	คือ ผลผลิตของเซลล์ที่ได้ต่อซับสเตรทที่ใช้ไป
	productivity	คือ ค่าอัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
กำหนดให้	X_0	คือ น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
	X_t	คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ณ เวลาใดๆ (กรัมต่อลิตร)
	P_0	คือ ความเข้มข้น P(3HB) เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
	P_t	คือ ความเข้มข้น P(3HB) ณ เวลาใดๆ (กรัมต่อลิตร)
	S_0	คือ ปริมาณซับสเตรทเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
	S_t	คือ ปริมาณซับสเตรทที่ถูกใช้ไป ณ เวลาใดๆ (กรัมต่อลิตร)
	t	คือ เวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)

2. การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักถ้วยที่มีเซลล์} - \text{น้ำหนักถ้วยเปล่า} \times 1,000}{\text{ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ปั่นเหวี่ยง}}$$

3. การคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่าง

$$\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{OD}_{490} \times \text{ค่าการเจือจาง}}{\text{ความชื้น}}$$

4. การคำนวณปริมาณ P(3HB) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี

การคำนวณปริมาณ P(3HB) (กรัมต่อลิตรต่อเซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัม) ประมวลผลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป star chromatogram: version 4.02 ซึ่งจะทำการคำนวณปริมาณ P(3HB) (กรัมต่อลิตร) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในสภาวะเดียวกัน ดังนี้

$$\text{ปริมาณ P(3HB) (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าจากการวิเคราะห์} \times \text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)}}{20}$$

20

5. การคำนวณแอกติวิตีของเอนไซม์

$$\text{แอกติวิตีของเอนไซม์ (unit/ml)} = \frac{\text{OD} \times \text{ปริมาตรทั้งหมด} \times \text{ค่าการเจือจาง}}{\epsilon \times \text{ปริมาตรของเอนไซม์}}$$

เมื่อ ϵ (molar extinction coefficient) คือ ค่าดูดกลืนแสงของสาร เมื่อละลายในตัวทำละลาย 1 โมล

กำหนดให้ OD_{303} สำหรับการวิเคราะห์ปีต้า-คีโตไทโอเลส

OD_{412} สำหรับการวิเคราะห์ซิติเรท ซินเทส

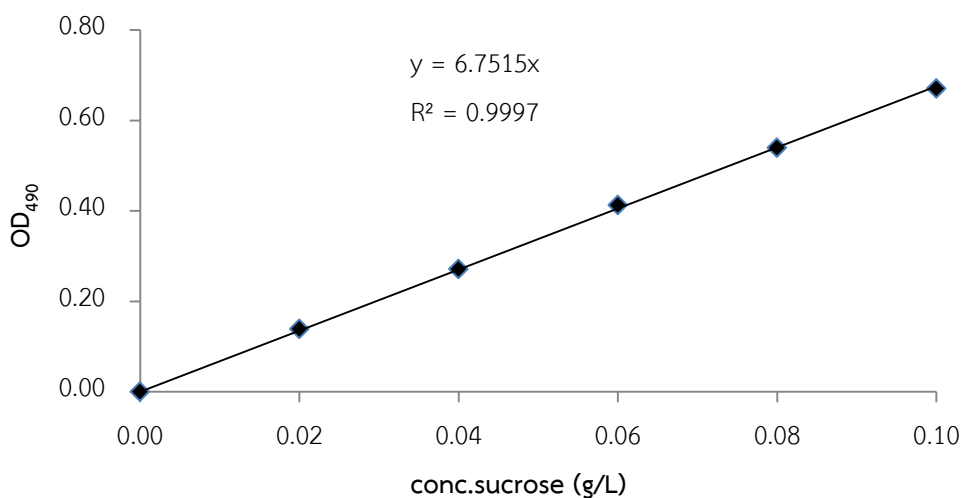
ϵ ของ acetoacetyl-CoA = $1.726 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ สำหรับการวิเคราะห์ปีต้า-คีโตไทโอเลส

ϵ ของ CoA = $1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ สำหรับการวิเคราะห์ซิติเรท ซินเทส

ภาคผนวก ค

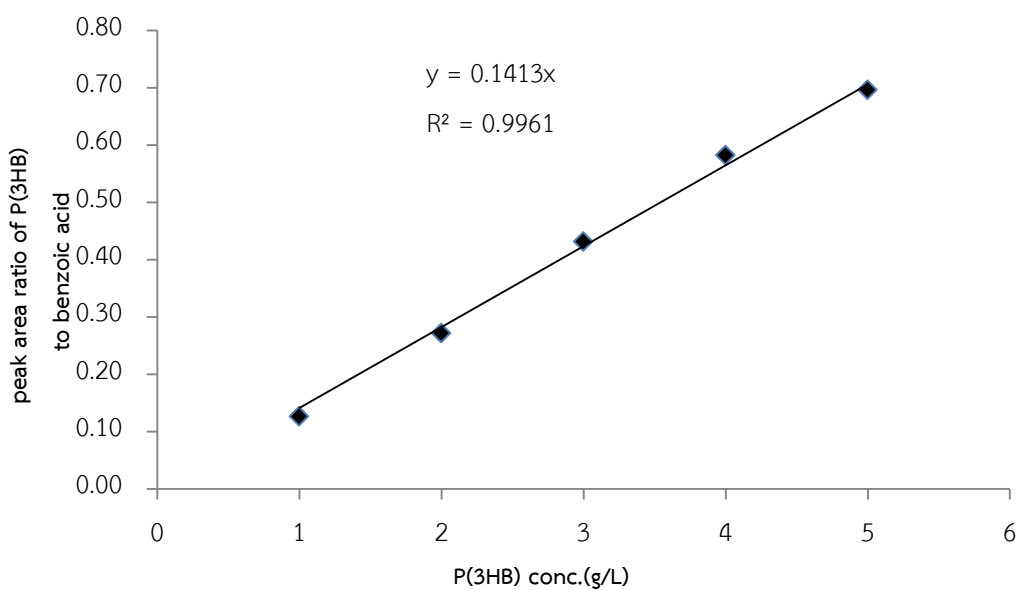
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรวม



กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครสในช่วง 0.00-0.10 กรัมต่อลิตร มีค่าความชันคือ 6.7515

2. กราฟมาตรฐาน P(3HB) วิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟี

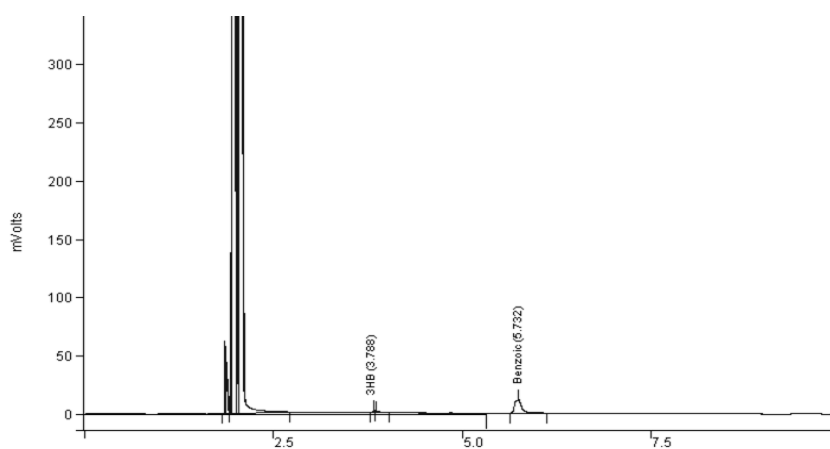


กราฟมาตรฐานของ P(3HB) ความเข้มข้น 0-5 กรัมต่อลิตร มีค่าความชันคือ 0.1413

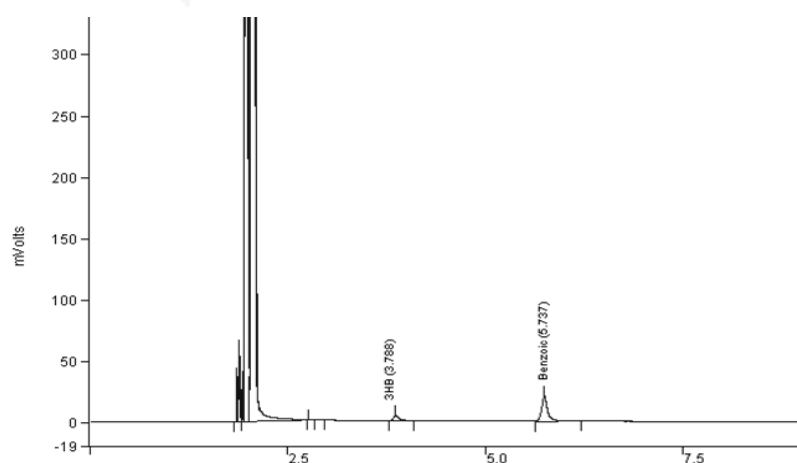
ภาคผนวก ค

โครมาโทแกรม

1. โครมาโทแกรมวิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี



โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3HB) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี GC โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน



โครมาโทแกรมของ P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี GC โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายณธรง ศิริคง เกิดเมื่อวันที่ 13 มิถุนายน พ.ศ. 2531 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน เมื่อปีการศึกษา 2554 และได้ศึกษาในระดับ บัณฑิตศึกษา หลักสูตรจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555

ในระหว่างการศึกษาได้เข้าร่วมเสนอผลงานทางวิชาการระดับนานาชาติในงาน “Burapha University International Conference 2015” ณ โรงแรมบางแสนเฮอริเทจ อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ระหว่างวันที่ 10-12 กรกฎาคม พ.ศ. 2558 ในหัวข้อ “The Influence of Dissolved Oxygen Concentration on Key Enzyme Involved in Cell Growth and Poly-3-hydroxybutyrate Synthesis in *Bacillus megaterium* strain BA-019”