บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1. สรุปผลการทดลอง

1. จากการศึกษาการเจริญของ *P. oleovorans* ในน้ำมันปาล์มดิบรูปแบบต่างๆ ได้แก่ น้ำมันปาล์มดิบตามธรรมชาติ น้ำมันปาล์มดิบที่ผ่านการสะพอนิฟาย พีเอช 7 และ 8 และการใช้ทั้งสองรูปแบบร่วมกัน พีเอช 7 และ 8 ปริมาณ 2 มิลลิโมลาร์ พบว่าแบคทีเรียเจริญได้ดีที่สุด เมื่อใช้น้ำมันปาล์มดิบที่ผ่านการสะพอนิฟาย พีเอช 7 โดยมีจำนวนเซลล์สูงสุด 2.2×10^{9} CFU/mL ซึ่งมากกว่าเมื่อใช้น้ำมันปาล์มดิบตามธรรมชาติถึง 10 เท่า และมากกว่าการใช้ 2 รูปแบบร่วมกัน ประมาณ 3 เท่า

2. การเลี้ยง *P. oleovorans* โดยใช้น้ำมันปาล์มที่ผ่านการสะพอนิฟาย ปริมาณ 2 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเพื่อการผลิต PHA แบคทีเรียสามารถผลิต PHA ได้สูงสุด ในชั่วโมงที่ 12 เท่ากับ 23 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 4.97 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

3. โพลีเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยง *P. oleovorans* ใน SCPO เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NMR FT-IRและ GC-MS พบว่าเป็น PHA ที่เป็นโคโพลีเมอร์ มีกรด 3-ไฮดรอกซี-เฮกซะดีคาโนอิค (palmitic acid : C_{16}) เป็นองค์ประกอบหลักร้อยละ 67 รองลงมาคือกรด 3-ไฮดรอกซีออกตะดีคาโนอิค (stearic acid : C_{18}) ปริมาณร้อยละ 20 ส่วนกรดไขมันอื่นๆ ในโพลีเมอร์ เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว

5.2. วิจารณ์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้เลือกน้ำมันปาล์มดิบ เลี้ยง *P. oleovorans* พบว่าการทำให้น้ำมันพืชอยู่ในรูปสะพอนิฟายจะทำให้เชื้อเจริญดีที่สุด เช่นเดียวกับการใช้ออกตะโนเอต แทนออกเทน เนื่องจากแหล่งคาร์บอนอยู่ในสภาวะที่ละลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงทำให้สามารถลดปริมาณแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ในงานวิจัยที่มีการใช้น้ำมันเมล็ดปาล์มที่ผ่านการสะพอนิฟายเลี้ยง *P. putida* PGA 1 (Tan และคณะ, 1997) เนื่องจากแบคทีเรียที่ใช้ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปส (Lipase enzyme)ได้ จึงจำเป็นต้องผ่านการสะพอนิฟายก่อน แต่ถึงแม้ว่า *P. oleovorans* จะสร้างเอนไซม์ไลเปสย่อยน้ำมันพืชเป็นกรดไขมันมาใช้ได้ ก็พบว่าการเจริญไม่ดีเท่ากับการใช้กรดไขมันที่ไม่ต้องย่อย ในสภาวะที่กรดไขมันผ่านการสะพอนิฟายแบคทีเรียสัมผัสกับอาหารได้มากขึ้น การใช้น้ำมันปาล์มดิบสะพอนิฟายนอกจากจะทำให้แบคทีเรียเจริญดีกว่าการใช้น้ำมันปาล์มตามธรรมชาติแล้ว ยังประหยัดกว่าการใช้เกลือของกรดไขมันบริสุทธิ์ซึ่งมีราคาสูง

การใช้น้ำมันปาล์มดิบที่ผ่านการสะพอนิฟาย ซึ่งมีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว ผสมลงในน้ำมันปาล์มดิบเพื่อทำเป็นอิมัลชัน (emulsion) แบคทีเรียเจริญได้ไม่ดีเท่ากับการใช้น้ำมันปาล์มดิบที่ผ่านการสะพอนิฟายเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามผลการทดลองพบว่าอิมัลชันของน้ำมันปาล์ม ช่วยให้แบคทีเรียเจริญได้ดีกว่าการใช้น้ำมันปาล์มดิบตามธรรมชาติเพียงอย่างเดียว ดังนั้นประโยชน์ของการทำอิมัลชัน จะได้ผลในกรณีที่แบคทีเรียที่ชอบใช้น้ำมันเป็นอาหาร มากกว่าน้ำมันที่ผ่านการสะพอนิฟาย หรือในการผลิตสารชีวภาพ เช่น เอนไซม์ไลเปส โดยเพิ่มการสัมผัสอาหารของแบคทีเรียโดยการเพิ่มพื้นที่ผิว การใช้สารลดแรงตึงผิวที่มาจากแหล่งเดียวกับน้ำมันที่ใช้ ทำให้ไม่เกิดการปนเปื้อนของสารคาร์บอนชนิดอื่น จะสามารถแปรผลการเจริญและวิเคราะห์ผลิตผลที่ได้จากแหล่งคาร์บอนชนิดเดียวได้ง่าย

ก่อนหน้านี้มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการผลิต PHA โดยใช้แบคทีเรียชนิดเดียวกัน คือ *P. oleovorans* เลี้ยงในอัลเคนร้อยละ 20 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือประมาณ 615 มิลลิโมลาร์ ได้ปริมาณ PHA 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้เวลาเลี้ยง 27 ชั่วโมง (Lageveen และคณะ, 1988) ต่อมามีผู้ใช้อัลคาโนเอต ซึ่งเป็นการทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นวัฏภาคเดียวให้เชื้อสัมผัสอาหารได้มากขึ้น จึงใช้สารคาร์บอนเพียง 10 มิลลิโมลาร์ และได้ PHA 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้เวลาเลี้ยง 20 ชั่วโมง (Brandl และคณะ, 1988) เมื่อใช้กรดปาล์มิติคปริมาณ 2 มิลลิโมลาร์

เป็นแหล่งคาร์บอนจะได้ PHA 3.4 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาเลี้ยง 20 ชั่วโมง และเมื่อใช้กรดโอเลอิค ปริมาณ 5 มิลลิโมลาร์ จะได้ PHA 7.4 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาเลี้ยง 20 ชั่วโมงเท่ากัน ในงานวิจัยนี้ใช้น้ำมันปาล์มดิบสะพอนิฟายปริมาณ 2 มิลลิโมลาร์ ได้ PHA 23 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือคิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง แสดงในตารางที่ 5-1

เมื่อเปรียบเทียบแล้วการใช้น้ำมันปาล์มดิบสะพอนิฟายเป็นแหล่งคาร์บอน จะใช้เวลาเวลาในการเลี้ยงแบคทีเรียน้อยกว่าการใช้สารคาร์บอนชนิดอื่น ส่วนปริมาณ PHA เมื่อเปรียบเทียบกับสารคาร์บอนที่มีองค์ประกอบคล้ายคลึงกันคือ กรดปาล์มิติค และกรดโอเลอิค พบว่าปริมาณ PHA ที่ได้จากงานวิจัยนี้ คิดเป็นค่าร้อยละจะอยู่กึ่งกลางระหว่างปริมาณ PHA ที่ได้จาก hexadecanoate(palmitate) และ oleate เป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากในน้ำมันปาล์มดิบประกอบด้วยกรดไขมัน 2 ชนิดนี้ในปริมาณร้อยละ 44 และ 39 ตามลำดับ จึงเป็นปริมาณที่เหมาะสมกับการพัฒนาขั้นต่อไปที่น่าศึกษาก็คือ การปรับปริมาณของสารคาร์บอนที่ให้ และการหาภาวะที่เหมาะสม ที่ทำให้ *P. oleovorans* สามารถสร้าง PHA ได้มากที่สุดจากน้ำมันปาล์มดิบในรูปนี้ เพราะว่าเมื่อเปรียบเทียบปริมาณคาร์บอนที่ให้และเวลาที่ใช้เลี้ยงแล้ว จะน้อยกว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนอื่นๆ (ตารางที่ 5-1)

เมื่อวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ PHA โดย NMR พบว่าลักษณะสเปกตรัม ^{1}H-NMR ของโพลีเมอร์ที่แยกจาก *P. oleovorans* ที่ใช้ SCPO เป็นแหล่งคาร์บอน คล้ายกับสเปกตรัมของโพลีเมอร์ที่แยกจาก *P. putida* KT 2442 ที่ใช้กรดโอเลอิค เป็นแหล่งคาร์บอน (Eggink และคณะ, 1992) ดังแสดงในภาคผนวกที่ 1 ส่วนลักษณะสเปกตรัม ^{13}C-NMR ของโพลีเมอร์ที่ได้มีลักษณะคล้ายกับสเปกตรัมของโพลีเมอร์ จาก *P. putida* PGA 1 ที่ใช้น้ำมันเมล็ดปาล์มที่ผ่านการสะพอนิฟาย เป็นแหล่งคาร์บอน (Tan และคณะ, 1997) ดังแสดงในภาคผนวกที่ 2 และสเปกตรัมของโพลีเมอร์จาก *P. resinovorans* ที่ใช้ไขสัตว์เป็นแหล่งคาร์บอน (Cromwick และคณะ, 1996) ดังแสดงในภาคผนวกที่ 3 เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีส่วนประกอบคล้ายคลึงกัน ลักษณะอินฟราเรดสเปกตรัมของ PHA ที่ได้จะคล้ายกับสเปกตรัมของ PHA จาก *P. oleovorans* ที่เลี้ยงในนอร์มัล ออกเทน (Lageveen และคณะ, 1988) ดังแสดงในภาคผนวกที่ 4

ตารางที่ 5-1 การผลิต PHA จากแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ใน *P. oleovorans* ระดับขวดเขย่า

แหล่งคาร์บอน	ปริมาณ	เวลาในการเจริญ (ชั่วโมง)	ปริมาณเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	% PHA	งานวิจัย
n-octane	20 % (v/v) (615 mM)	27	2	500	25	Lageveen และคณะ, 1988
n-octanoic acids (formate to decanoate)	10-20 mM	20	1.5	330	28	Brandl และคณะ, 1988
Butyrate	20 mM	20	—*	—*	0.6	Huismanและคณะ, 1988
Valerate					0.7	
Hexanoate					3.3	
Heptanoate	10 mM				2.3	
Octanoate					8.7	
Nonanoate					9.1	
Decanoate					12.5	
Undecanoate					9.8	
Dodecanoate					6.6	
Tridecanoate					5.4	
Tetradecanoate	5 mM				10.6	
Pentadecanoate	2 mM				5.3	
Hexadecanoate					3.4	
Oleate	5 mM				7.4	
Elaidate					11.2	
Linolenate					5.9	
Hydroxy-6-octenoic acid	10 mM	24	0.550	68.5	12.5	Fritzsce และคณะ, 1988
Hydroxy-7-octenoic acid		26	0.617	63.5	10.3	
Tallow free fatty acid	2.4-2.79 g/L (20 mM)	48	1.600	210 -378	18	Cromwick และคณะ, 1988
Saponified crude palm oil	2 mM	12	0.463	23	4.97	งานวิจัยนี้

* ไม่ได้รายงานไว้

ในงานวิจัยอื่นๆ ที่ผลิต PHA โดยใช้ *P. oleovorans* ATCC 29347 ได้ PHA ที่ประกอบด้วยหน่วยโครงสร้างสายยาวที่สุด ได้แก่ กรดไฮดรอกซีเตตระดีคาโนอิค (Hydroxytetradecanoic acid : $C_{14:0}$) และ กรดไฮดรอกซีเตตระดีซีโนอิค (Hydroxytetradecanoic acid : $C_{14:1}$) เมื่อใช้กรดไขมันจากไขสัตว์ (กรดไขมันจากไขสัตว์ ประกอบด้วย กรดโอเลอิค 45 เปอร์เซ็นต์ กรดสเตียริค 25 เปอร์เซ็นต์ และกรดปาล์มิติค 25 เปอร์เซ็นต์) เป็นแหล่งคาร์บอน (Cromwick และคณะ, 1996) หน่วยโครงสร้างของ PHA ที่เป็นองค์ประกอบหลักจะมีความยาวคาร์บอนเท่ากับคาร์บอนตั้งต้นที่ใช้ ตั้งแต่ C_6- C_{12} แต่เมื่อสารคาร์บอนในอาหาร มีความยาวมากกว่า C_{12} หน่วยโครงสร้างของ PHA ที่เป็นองค์ประกอบหลักจะเป็น C_8 (hydroxyoctanoate) รองลงมาเป็น C_{10} (hydroxydecanoate) (Lageveen และคณะ, 1988 ; Brandl และคณะ, 1988 ; Huisman และคณะ, 1989) ดูตารางประกอบในภาคผนวกที่ 12 ในงานวิจัยนี้ *P. oleovorans* ผลิต PHAที่มี C_{16} เป็นองค์ประกอบหลักซึ่งไม่เคยมีรายงานมาก่อน

ในงานวิจัยที่เคยมีรายงานที่ใช้ Pseudomonads อื่นๆ เช่น *P. aeruginosa* 44T1 เมื่อเลี้ยงโดยใช้น้ำมันละหุ่งเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า PHA ที่ได้เป็นกรดไฮดรอกซีออกตะดีซีโนอิค (12-hydroxy-9c-octadecenoic acid : $C_{18:1}$) ปริมาณ 7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมาจากส่วนประกอบหลัก ในน้ำมันละหุ่ง (ricinoleic acid) (Eggink และคณะ, 1995) PHA จากงานวิจัยนี้มาจากส่วนประกอบหลักในน้ำมันปาล์มดิบเช่นเดียวกัน แต่มีปริมาณมากถึง 67 เปอร์เซ็นต์ และหน่วยโครงสร้างหนึ่งของ PHA จากงานวิจัยนี้ คล้ายกับ PHA จากน้ำมันละหุ่ง ที่รายงานว่าเป็น PHA ชนิดใหม่ คือ กรดไฮดรอกซีออกตะดีซีโนอิค (9-hydroxy octadecenoic acid : $C_{18:1}$) มีปริมาณใกล้เคียงกัน คือ 8 เปอร์เซ็นต์ PHA ที่ประกอบด้วย C_{18} ที่มีพันธะคู่ จะเป็นโพลีเมอร์ที่มีความยืดหยุ่นสูง และมีความเหนียวเพิ่มมากขึ้นด้วย เพราะสามารถปรับสมบัติทางเคมีและทำให้เกิดโครงร่างตาข่ายในโมเลกุล จะนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น (Eggink และคณะ, 1995)

ดังนั้นข้อดีของงานวิจัยนี้ คือ เป็นการลดต้นทุนการผลิต PHA ได้มาก เนื่องจากใช้วัตถุดิบที่มีในประเทศคือน้ำมันปาล์มดิบและการใช้น้ำมันปาล์มดิบในรูปแบบที่ผ่านการสะพอนิฟาย เป็นการลดปริมาณสารคาร์บอนที่ใช้เลี้ยงเชื้อจึงประหยัดมากขึ้น นอกจากนี้ PHA ที่ได้จากการใช้น้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอนในงานวิจัยนี้ พบว่ายังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ซึ่งคาดว่าจะเป็น PHA ชนิดใหม่ จะเป็นแนวทางในการผลิต PHA ที่มีคุณสมบัติแตกต่างจากที่เคยมีผู้ผลิต เนื่องจากในภูมิภาคนี้มีการใช้น้ำมันปาล์มอย่างแพร่หลาย ต่อไปอาจศึกษาการใช้น้ำมันปาล์มที่เหลือจากการใช้งานในด้านต่างๆ เช่น น้ำมันที่เหลือจากการใช้ในครัวเรือน หรือจากอุตสาหกรรม เป็นต้น นำมาใช้ในการผลิต PHA จะทำให้สิ่งที่ใช้ประโยชน์ไม่ได้แล้วเกิดประโยชน์ขึ้นมา กลายเป็นแหล่งของสารคาร์บอนที่น่าสนใจ เพราะอาจผลิต PHA ที่มีคุณสมบัติที่ดีขึ้น

การวิจัยและพัฒนาต่อจากการวิจัยนี้คือ การหาภาวะที่เหมาะสมเพื่อผลิต PHA ให้ได้ปริมาณมาก การศึกษาสมบัติของโพลีเมอร์ชนิดนี้ และศักยภาพที่จะนำไปใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ เพื่อให้สามารถแทนที่พลาสติกสังเคราะห์ได้ในอนาคต