บทที่ 4

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

PHB เป็นพอลีเอสเทอร์ที่สร้างและสะสมโดยจุลินทรีย์หลายชนิด โดยทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงานภายในเซลล์ (Anderson, 1990) เนื่องจากความสามารถในการย่อยสลายได้เองโดยธรรมชาติ (Biodegradability) แล้วผลจากการย่อยสลาย ได้สารที่ไม่เป็นพิษ รวมทั้ง คุณสมบัติทางเชิงกลที่จำเพาะ ทำให้ PHB เป็นวัตถุดิบ (raw material) ที่มีความน่าสนใจ ในการนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่างๆ ตามความเหมาะสม (Griffin และ Magor, 1987) จุลินทรีย์หลายชนิดในแหล่งธรรมชาติ สามารถสร้าง และสะสม PHB ดังเช่น ในกากตะกอนที่ได้จากการบำบัดน้ำเสีย (Wallen และRohwedder, 1974 ; Odham และคณะ, 1986 ; Ree และคณะ, 1993) ตะกอนจากทะเล (Findlay และ White, 1983) เป็นต้น

วิธีหนึ่งที่สามารถลดต้นทุนการผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรม คือ การใช้จุลินทรีย์ชนิดที่สร้าง PHB ได้ปริมาณสูง และ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกได้ (Zhang และคณะ, 1994) งานวิจัยนี้ ได้คัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติต่างๆ ด้วยการย้อมสี Sudan Black B ได้จุลินทรีย์ จำนวน 30 สายพันธุ์ เมื่อตรวจสอบความสามารถในการสร้างและสะสม PHB ด้วยวิธีทางเคมี โดยเลี้ยงในอาหาร MSM ซึ่งศึกษาแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาล 3 ชนิด ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 สามารถสร้าง และสะสม PHB ในปริมาณที่มากกว่าจุลินทรีย์อื่นๆ โดยได้ปริมาณ PHB มากที่สุด เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 13.21 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และยังสามารถสร้างและสะสม PHB ในอาหารที่มี กลูโคสและฟรุกโตส เป็นแหล่งคาร์บอนได้ แต่ได้ในปริมาณที่ต่ำกว่า คือเท่ากับ 7.91 และ 9.02 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ

การสร้าง และสะสม PHB ของจุลินทรีย์ ประกอบด้วย 2 กระบวนการ คือ ขั้นตอนแรก เชื้อจะนำสารอาหารไปสร้างองค์ประกอบของเซลล์ และ ในขั้นตอนที่สอง

เซลล์จะสร้าง และสะสม PHB โดยอาจมีการเติบโตเพิ่มอีกเล็กน้อย หรือ อาจไม่มีการเติบโตเพิ่มขึ้น และขนาดของเซลล์ มักจะใหญ่ขึ้น ซึ่งเนื่องมาจาก การสะสม PHB ภายในเซลล์ ดังนั้นการทำให้เชื้อมีการผลิตเซลล์จำนวนมากในขั้นตอนแรก ทำให้ได้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้น ผลการวิจัย พบว่า อาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อที่เหมาะสม คือ อาหารสูตรที่ 2 โดยในอาหารสูตรที่ 2 จะมีองค์ประกอบที่แตกต่างจาก อาหารสูตรที่ 1 และ 3 เฉพาะแหล่งคาร์บอนเท่านั้น กล่าวคือ มีน้ำตาลฟรุกโตส ทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้น จึงเห็นได้ว่าแหล่งคาร์บอนจึงเป็นส่วนหนึ่งที่มีความสำคัญใน การช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ และเมื่อศึกษาถึงระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงกล้าเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ ในอาหารสูตรที่ 2 จากผลการวิจัยนี้ พบว่า เวลา 30 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงกล้าเชื้อ ซึ่งถึงแม้ว่า ชั่วโมงที่ 30 จะไม่ใช่เวลาที่ให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด แต่เนื่องจากเป็นช่วงที่แบคทีเรียมีการเจริญแบบทวีคูณ (exponential phase) กล่าวคือ สามารถเติบโตได้ปริมาณน้ำหนักเซลล์มากพอสมควร โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.24 กรัมต่อลิตร โดยที่เวลา 36 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่ให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่า คือ 4.32 กรัมต่อลิตร แต่เวลา 36 ชั่วโมง เป็นช่วงเวลาที่เซลล์มีการเจริญอยู่ในช่วงการเจริญคงที่ (stationary phase) แล้ว ในชั่วโมงที่ 36 สารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณลดลง จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cells) มีปริมาณลดลง และเซลล์มีแอคติวิตี้ (activity) ต่ำกว่า เซลล์ที่อยู่ในระยะการเจริญแบบทวีคูณ เมื่อเปรียบเทียบ ผลของงานวิจัยนี้ กับ งานวิจัยของชนัญ ผลประไพ (2537) โดย ชนัญ (2537) ได้ทำการวิจัยศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ และระยะเวลาในการเลี้ยงกล้าเชื้อ ของเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยได้ใช้สูตรอาหาร 3 ชนิด ที่มีชนิดและปริมาณของสารอาหาร เช่นเดียวกับ ในงานวิจัยนี้ พบว่าอาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่เหมาะสม ที่เวลา 30 ชม.(ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 8.79 กรัมต่อลิตร) จึงอาจสรุปได้ว่า อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 มีองค์ประกอบของสารอาหาร และแหล่งคาร์บอน ที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อให้ได้ปริมาณมาก

ในปัจจุบันการใช้น้ำตาลกลูโคส หรือฟรุกโตส เป็นแหล่งคาร์บอน ในการผลิต PHB ยังเป็นการผลิตที่ไม่คุ้มทุน เนื่องจาก ราคาต้นทุนการผลิตสูง จำเป็นที่จะต้องหาสารอาหารที่มีราคาถูกกว่าน้ำตาลทั้งสองชนิดดังกล่าว (King, 1982) จึงจะเป็นทางหนึ่งที่มีความเป็นไปได้ในการลดต้นทุนการผลิต น้ำตาลซูโครส และกากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความน่าสนใจ

ในการนำมาผลิต PHB เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีว่า มีราคาถูกกว่าน้ำตาล 2 ชนิดแรก และเป็นข้อดีของเชื้อ BA-019 ประการหนึ่งด้วยที่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ดีกว่า การใช้น้ำตาลกลูโคส และฟรุกโตส ในการผลิต PHB ดังนั้นในการวิจัยขั้นต่อมา จึงมีการเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลที่มีซูโครสเป็นองค์ประกอบ โดยมีความมุ่งหมายว่า ถ้าสามารถใช้แหล่งน้ำตาลอื่น ที่มีราคาถูกยิ่งกว่าน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์ ก็จะยิ่งเป็นการดีในการลดต้นทุนการผลิตในส่วนของราคาของแหล่งคาร์บอน จากผลการวิจัย เปรียบเทียบการใช้ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง และ กากน้ำตาลในปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ในอาหาร MSM ในการสร้างและสะสม PHB โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ได้พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 สามารถสร้างและสะสม PHB ได้มาก ในอาหารที่มีกากน้ำตาล ปริมาณ 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) คือได้เท่ากับ 31.84 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งเพิ่มขึ้นจากเดิม (13.21 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นอย่างมาก แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของกากน้ำตาลเป็น 6 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณของ PHB ที่ผลิตได้ใกล้เคียงกัน (29.72 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) Page (1992) ศึกษาการสร้าง และสะสม PHB โดยเชื้อ *Azotobacter vinelandii* strain UWD โดยเลี้ยงเปรียบเทียบ การใช้น้ำตาลบริสุทธิ์ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส และ ซูโครส เป็นต้น กับ น้ำตาลไม่บริสุทธิ์ได้แก่ กากน้ำตาล malt extract และ corn syrup เป็นต้น เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การใช้น้ำตาลไม่บริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอนให้ปริมาณ PHB ที่มากกว่าการใช้น้ำตาลบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน โดย malt extract เป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณ PHB สูงสุด คือเท่ากับ 2.80 กรัมต่อลิตร หรือ 66 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนกากน้ำตาล จะให้ปริมาณ PHB รองลงมา คือเท่ากับ 2.74 กรัมต่อลิตร หรือ 60 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเปรียบเทียบ ปริมาณ PHB ที่ได้จากการใช้กากน้ำตาล กับ ปริมาณ PHB ที่ได้จาก การใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า ได้ปริมาณที่เท่ากันคือเท่ากับ 60 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีรูปแบบการเจริญที่เหมือนกัน รวมทั้งเมื่อศึกษาถึง การเพิ่มปริมาณกากน้ำตาล ตั้งแต่ 2 จนถึง 6 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่า ปริมาณ PHB ที่ได้มีค่าแตกต่างกันเล็กน้อย แต่จะมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณของกากน้ำตาล เห็นได้ว่า กากน้ำตาลช่วยกระตุ้นการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* UWD ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลงานวิจัยนี้ กับ งานวิจัยของ Page (1992) สรุปได้ว่า มีความสอดคล้องกัน จึงอาจเป็น

ไปได้ว่า การเพิ่มปริมาณ PHB ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอน อาจเพิ่มขึ้นจากสารอาหารอื่นที่เป็นองค์ประกอบในกากน้ำตาลด้วย ซึ่งในกากน้ำตาล ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตคือ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และ น้ำตาลฟรุกโตส เท่ากับ 57 21 และ 20 เปอร์เซนต์ของน้ำตาลทั้งหมด นอกจากนี้ยังมีไนโตรเจนในรูปอินทรีย์ไนโตรเจน (ส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโน และ บีเทน (betaine) และ สารที่ไม่ใช่ไนโตรเจน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดอินทรีย์ ประมาณ 12 ถึง 13 เปอร์เซนต์ เกลือแร่ และ เถ้า (ash) ประมาณ 11 ถึง 12 เปอร์เซนต์ ของส่วนที่เป็นของแข็งทั้งหมดของกากน้ำตาล (Page, 1989) จากผลงานวิจัยนี้ น้ำตาลที่มีความไม่บริสุทธิ์ เช่น กากน้ำตาล และน้ำตาลทรายแดง จะช่วยกระตุ้นการสร้างและสะสม PHB ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ให้มีปริมาณมากขึ้น จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลทั้ง 4 ชนิด ด้วยวิธี HPLC พบว่า องค์ประกอบของกากน้ำตาล และน้ำตาลทรายแดง นอกจากจะมีน้ำตาลซูโครสแล้ว ยังมีน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตสประกอบด้วย นอกจากนี้เป็นที่ทราบกันดีว่า ในกากน้ำตาล ยังมีองค์ประกอบอื่นปะปน ได้แก่ เกลือแร่ อินทรีย์ไนโตรเจน อาจจะเป็นสารอาหารที่ช่วยทำให้การสร้าง และสะสม PHB โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ให้มีปริมาณมากขึ้นกว่าน้ำตาลทรายแดง ซึ่งไม่มีแร่ธาตุต่างๆรวมอยู่เหมือนในกากน้ำตาล ก็เป็นได้ ในการวิจัยนี้ กากน้ำตาล ที่วิเคราะห์โดยวิธี HPLC ได้ปริมาณ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 10.10 5.13 และ 5.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จึงเป็นสารอาหารที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ได้ดีกว่า แหล่งคาร์บอนอื่นที่ทำการวิจัย

นอกจากแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการสร้าง และสะสม PHB การจำกัดสารอาหารบางชนิด ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสเฟต และ แมกนีเซียม เป็นต้น มีผลต่อ ปริมาณ PHB ที่เชื้อสร้างและสะสมขึ้น (Anderson, 1990) ไนโตรเจน เป็นธาตุที่จุลินทรีย์ต้องการในช่วงการเจริญ เพื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์ แต่ในช่วงที่มีการสร้าง และสะสม PHB มีรายงานว่าการจำกัดปริมาณไนโตรเจน อาจมีส่วนกระตุ้นให้เกิดการสร้าง และสะสม PHB เพิ่มขึ้น (Beaulieu และคณะ, 1995) ในงานวิจัยนี้ ชนิดของไนโตรเจนที่ใช้ในอาหาร MSM ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งหลังจากแปรผันปริมาณไนโตรเจน ลดลงเป็น 0.5 จนถึง 2.0 กรัมต่อลิตร แล้ว พบว่า ปริมาณที่เหมาะสมต่อ การสร้างและสะสม PHB ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร โดยได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 31.73 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนัก

เซลล์แห้ง เมื่อใช้กากน้ำตาลปริมาณ 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งปริมาณของแหล่งไนโตรเจนนี้ เป็นปริมาณที่เท่าเดิม ซึ่งประกอบอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตั้งแต่เริ่มวิจัย ซึ่งอาจแสดงว่า สำหรับเชื้อ BA-019 ที่ศึกษานี้ ต้องการปริมาณไนโตรเจนจำกัดเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร ถ้าจำกัดปริมาณน้อยกว่านี้ ปริมาณที่ได้น้อยลง ส่วนในอาหารที่มีปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตมากกว่า 1 กรัมต่อลิตร พบว่า ได้ปริมาณ PHB ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับ เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร Beaulieu และคณะ (1995) ศึกษาถึง อิทธิพลของ เกลือแอมโมเนียม และกากน้ำตาล ที่มีผลต่อการเจริญ และการสร้างและสะสม PHB โดยเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* พบว่า เกลือแอมโมเนียม ที่อยู่ในรูป แอมโมเนียมซัลเฟต จะให้การเจริญ และ การผลิต PHB ได้ปริมาณสูงสุด เท่ากับ 48 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง รองลงมา คือ เกลือที่อยู่ในรูปไนเตรทเท่ากับ 46 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง รูปคลอไรด์เท่ากับ 44 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ รูปฟอสเฟตเท่ากับ 41 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง Daniel และคณะ (1992) รายงานถึงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Pseudomonas* 135 ที่มีการจำกัดปริมาณเกลือแอมโมเนียมชนิดต่างๆ พบว่า เกลือของแอมโมเนียมในรูปต่างๆให้ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ไม่แตกต่างกัน โดยปริมาณ PHB สูงสุดที่ผลิตได้จากแอมโมเนียมซัลเฟต มีค่าเท่ากับ 55 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

ในทำนองเดียวกัน อาจอธิบายเรื่อง ผลวิจัยที่ได้จากการจำกัดปริมาณแร่ธาตุที่จำเป็นอื่นๆ ได้แก่ ฟอสเฟต และ แมกนีเซียม โดยในการจำกัดปริมาณฟอสเฟต ที่อยู่ในรูปอัตราส่วนระหว่าง KH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 ตั้งแต่ในอาหารที่ไม่ได้เติม KH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 จนถึงปริมาณเท่ากับ 3 และ 0.9 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะได้ปริมาณ PHB ที่สร้างและสะสม โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 เท่ากับ 31.05 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และการจำกัดปริมาณแมกนีเซียม ตั้งแต่อาหารที่ไม่ได้เติม $MgSO_4.7H_2O$ จนถึง ปริมาณเท่ากับ 0.3 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะได้ปริมาณ PHB ที่สร้าง เท่ากับ 30.81 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลแห้ง ในเวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ สรุปได้ว่า การจำกัดปริมาณฟอสเฟต และแมกนีเซียม รวมทั้ง การเปลี่ยนชนิดของฟอสเฟตไม่มีผล ในการช่วยให้เชื้อสร้าง และสะสม PHB เพิ่มขึ้น โดยปริมาณของฟอตเฟตที่อยู่ในรูปของ KH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 และ ปริมาณของแมกนีเซียมที่อยู่ในรูปของ $MgSO_4.7H_2O$ ที่เหมาะสมในการสร้าง PHB มีค่าเท่ากับ ปริมาณที่อยู่ในอาหาร

ชุดควบคุม คือ สัดส่วนของ KH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 เท่ากับ 0.6 และ 2.0 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณของแมกนีเซียมที่อยู่ในรูป $MgSO_4.7H_2O$ เท่ากับ 0.20 กรัมต่อลิตร จากการวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตในรูป PO_4^{-3} ปริมาณโพแทสเซียม ในรูป K^+ และ ปริมาณแมกนีเซียม ในรูป Mg^{+2} ในกากน้ำตาล ปริมาณ 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเครื่องไอซีพี (ICP; Atomic Emission spectrometer) และ เอเอ (AA; Atomic Absorption Spectrometer) เท่ากับ 0.29 2.4 และ 1.65 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ เมื่อคิดรวมปริมาณฟอสเฟต และ แมกนีเซียม ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่มีกากน้ำตาล ปริมาณ 4 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ปริมาณอัตราส่วนของฟอสเฟต และ แมกนีเซียม ที่มากกว่าชุดควบคุม จึงเป็นปริมาณที่มากเกินไป อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) ศึกษาการสร้าง และสะสม PHB ของเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 พบว่า จากการจำกัดปริมาณฟอสเฟต และ แมกนีเซียม ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ PHB ปริมาณเท่ากับ 41.71 และ 35.70 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ แต่เมื่อทำการจำกัดปริมาณไนโตรเจน พบว่า ปริมาณ PHB ที่ได้ เพิ่มขึ้นถึง 46.98 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง Daniel และคณะ (1992) รายงานถึงแร่ธาตุจำกัดที่จำเป็นต่อการผลิตปริมาณ PHB ในเชื้อ *Pseudomonas* 135 ได้แก่ แอมโมเนียม แมกนีเซียม และฟอสเฟต โดยการจำกัดปริมาณของแมกนีเซียมจะได้ปริมาณ PHB มากกว่า คือ ได้เท่ากับ 42.5 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนการจำกัดปริมาณฟอสเฟต ได้ PHB ปริมาณเพียง 34.5 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

จากรายงานของ Wakisaka และคณะ (1982)ได้กล่าวถึง ความสำคัญของฟอสเฟต และ โพแทสเซียม ที่มีต่อการสร้างและสะสม PHB ในเชื้อ *Bacillus thuringenesis* ซึ่งมีรูปแบบการเจริญโดยมีการสร้างสปอร์ เช่นเดียวกันกับแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 การจำกัดปริมาณของโพแทสเซียมมีผลต่อกระบวนการสร้างสปอร์ โดยทำให้แบคทีเรียมีการสร้างสปอร์ได้น้อยลง และฟอสเฟตมีความสำคัญในการเป็นแหล่งของฟอสฟอรัส และพลังงานของเชื้อ โดยพบว่า เชื้อจะสร้าง และสะสม PHB เมื่อมีปริมาณของโพแทสเซียม น้อยกว่า 1 มิลลิโมล ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และ มีอิออนของฟอสเฟต เช่น ฟอสฟอรัส มากกว่า 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) ศึกษาในเชื้อ *Alcaligenes* sp.A-04 พบว่า การจำกัดปริมาณของฟอสเฟต และโพแทสเซียม ไม่มีผลต่อการเพิ่มการสร้าง และสะสม

PHB เมื่อเลี้ยงในภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากและมีการจำกัดไนโตรเจน โดยผลการวิจัยเป็นในลักษณะเดียวกับ ผลการวิจัยนี้ ที่เลี้ยงเชื้อในภาวะจำกัดปริมาณฟอสเฟตและโพแทสเซียม แล้วไม่มีผลในการเพิ่มปริมาณ PHB (ไม่ดีกว่าชุดควบคุม) และ อัญชนา ศุรติชจร (2537)ซึ่งศึกษาในเชื้อสายพันธุ์เดียวกันกับอรุณ (2536) ในการผลิตโคพอลีเมอร์ (copolymer) ก็ได้ผลการวิจัยในทำนองเดียวกัน สรุปได้ว่า ผลของการจำกัดปริมาณสารอาหารที่จำเป็น แต่ละชนิดที่มีต่อปริมาณ PHB นั้น มีความแตกต่างกันไป ขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของจุลินทรีย์ชนิด และปริมาณของสารอาหาร และ ภาวะในการเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ดังนั้น ในส่วนของสารอาหาร ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่อาจมีผลต่อการสร้าง และสะสม PHB นั้น การจำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ฟอสเฟต แมกนีเซียม และโพแทสเซียม ก็อาจไม่มีผล หรือ มีผลน้อยต่อปริมาณ PHB ก็เป็นได้ ดังที่กล่าวแล้วว่า มีรายงานจากผู้วิจัยหลายคน เช่น อรุณ (2536) อัญชนา (2537) โดยเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 นอกจากนี้ Kofronova และคณะ (1994) ก็สรุปผลไว้เช่นเดียวกันว่า การสร้าง PHB โดยเชื้อ *Bacillus megaterium* มีผลกระทบจากองค์ประกอบของอาหาร เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

จากรายงานของ Page(1992) ซึ่งกล่าวถึง การที่อินทรีย์ไนโตรเจนในกากน้ำตาลมีส่วนช่วยเพิ่ม การสร้าง และสะสม PHB และการใช้แหล่งไนโตรเจนซับซ้อน (complex nitrogen) ที่ได้จากแหล่งต่างๆ เช่น จากปลา (fish peptone) จากเนื้อวัว (beef extract) และ จากยีสต์ (yeast extract) เป็นต้น มีผลในการเพิ่มการสร้างและสะสม PHB ได้เช่นกัน โดย Page ได้ศึกษาการสร้าง และสะสม PHB ที่ได้จากเชื้อ *Azotobacter vinelandii* strain UWD ที่เลี้ยงโดยใช้ แหล่งไนโตรเจน เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ซับซ้อน พบว่า ใน fish peptone มีการสร้าง และสะสม PHB ได้ปริมาณสูงสุด คือ 74 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง หรือ 7.5 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ โปรติโอสเปปโตน หมายเลข 3 เท่ากับ 74 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง หรือ 6.8 กรัมต่อลิตร และ สารสกัดจากยีสต์ ซึ่งมีปริมาณ PHB เท่ากับ 73 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง หรือ 6.8 กรัมต่อลิตร ทำให้ผู้วิจัย จึงได้เกิดแนวคิดว่า การที่ในองค์ประกอบของกากน้ำตาล ซึ่งมีอินทรีย์ไนโตรเจนอยู่ปริมาณหนึ่งแล้ว อาจเพียงพอ ในการที่จะใช้ในการเติบโต รวมทั้ง การสร้าง และสะสม PHB หรือ จำเป็นต้องมีการให้อินทรีย์ไนโตรเจน เพิ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ อีกปริมาณหนึ่ง (แปรผันปริมาณเป็น 0.1 และ 1.0 กรัมต่อลิตร) โดยได้ทดลองใช้ชนิดของอินทรีย์ไนโตรเจน ชนิดอื่นๆ

อีก 5 ชนิด นอกเหนือไปจากสารสกัดจากยีสต์ซึ่งใช้อยู่เดิม โดยไม่ต้องใช้อินทรีย์ไนโตรเจน ซึ่งได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต จากผลการวิจัยนี้ พบว่า การใช้อินทรีย์ไนโตรเจน ในกากน้ำตาล ร่วมกับ อินทรีย์ไนโตรเจน ที่ให้ในสารอาหาร คือ สารสกัดจากยีสต์ ปริมาณ 0.10 กรัมต่อลิตร (ได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 28.83 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 24) ไม่เพียงพอ ในการเพิ่มการสร้าง และสะสม PHB ให้ได้ มากกว่า ชุดควบคุม ซึ่งมีทั้งอนินทรีย์ และอินทรีย์ไนโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ มีแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร และ สารสกัดจากยีสต์ ปริมาณ 0.10 กรัมต่อลิตร (รวมทั้งมีอินทรีย์ไนโตรเจนจากกากน้ำตาล) โดยได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 32.73 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อศึกษาถึง การใช้อินทรีย์ไนโตรเจนเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงแหล่งเดียว แต่ได้เพิ่มปริมาณของอินทรีย์ไนโตรเจน เป็น 1 กรัมต่อลิตร ก็ไม่ทำให้ปริมาณ PHB ที่สร้างและสะสมเพิ่มมากขึ้นแต่อย่างใด ผลการวิจัยที่ได้ ต่างจาก ผลวิจัยของ Page(1992) ซึ่งก็ได้ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเช่นกัน แล้วพบว่า ชนิดของอินทรีย์ไนโตรเจน เป็นแหล่งไนโตรเจนที่สามารถช่วยให้มีการสร้าง PHB เพิ่มขึ้น ในเชื้อ *Azotobacter vinelandii* สายพันธุ์ UWD ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ ปริมาณอินทรีย์ไนโตรเจน เท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร ในงานวิจัยนี้ เป็นปริมาณที่เพียงพอแล้ว การเพิ่มปริมาณอินทรีย์ไนโตรเจน จึงไม่ทำให้ปริมาณการสร้าง และสะสม PHB เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า การสร้างและสะสม PHB ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ในอาหารที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ต้องการอนินทรีย์ไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) เพื่อร่วมกับ อินทรีย์ไนโตรเจน ใช้ในการเติบโต และการสร้าง PHB เป็นที่ทราบกันว่า ถ้าในสารอาหารมีแหล่งไนโตรเจนในรูปของ อนินทรีย์ไนโตรเจน (เกลือแอมโมเนียม) จุลินทรีย์จะสามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ง่ายกว่าการให้แหล่งไนโตรเจนในรูปของ อินทรีย์ไนโตรเจน ซึ่งมักเป็นไนโตรเจนที่ซับซ้อนดังเช่น ในกรณีงานวิจัยนี้ เป็นสารสกัดจากยีสต์ ดังนั้นจึงอาจจะเป็นอีกเหตุผลหนึ่ง ที่อธิบายว่า ชุดควบคุมซึ่งมีแอมโมเนียมซัลเฟตประกอบอยู่ เชื้อ BA-019 จึงผลิต PHB ได้ปริมาณมากกว่า เมื่อเลี้ยงในแหล่งอาหารที่ประกอบด้วย อินทรีย์ไนโตรเจนเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว(Stanbury และ Whitaker, 1984) ซึ่งกลไกที่แหล่งไนโตรเจน มีผลต่อการสร้าง และสะสม PHB ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่อาจเป็นไปได้ว่า ในภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจน ทั้งอินทรีย์ และอนินทรีย์ไนโตรเจน อนินทรีย์ไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต จะเข้าสู่เซลล์

ในรูปของ แอมโมเนียม และเซลล์จะเปลี่ยนแอมโมเนียมให้เป็นอะซิทิลโคเอ และเป็น PHB ตามลำดับ (Yamane, 1993) ส่วนอินทรีย์ไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของ สารสกัดจากยีสต์ เชื้อจะนำไปใช้ในการสร้างเซลล์ โดยสารสกัดจากยีสต์ ซึ่งประกอบด้วย กรดอะมิโนต่างๆ เมื่อเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียจะถูกเปลี่ยนให้เป็นแอลฟา-คีโตกลูตาริก และ มีการเปลี่ยนแปลงต่อไป เป็นกรดอะมิโนตัวอื่นๆ ก่อนจะนำไปสังเคราะห์เป็นโปรตีนภายในเซลล์ อนินทรีย์ไนโตรเจน จึงเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ใช้ก่อนอินทรีย์ไนโตรเจน อาจสรุปได้ว่า อนินทรีย์ไนโตรเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เกลือแอมโมเนียมมีความเหมาะสม ในการใช้สำหรับการผลิต PHB มากกว่า แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ดังเช่น ในงานวิจัยของ อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) และ ชนัญ ผลประไพ (2537) ซึ่งศึกษาถึงการสร้าง PHB ในเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยเลี้ยงในระดับขวดเขย่า และ ถังหมัก ตามลำดับ พบว่า แอมโมเนียมซัลเฟต จำกัด ปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่เชื้อสามารถใช้ในการผลิต PHB ได้ ปริมาณเพิ่มขึ้น คือเท่ากับ 46.98 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในระดับขวดเขย่า และเท่ากับ 79.23 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในการเลี้ยงแบบ fed-batch ดังนั้น จากงานวิจัยนี้ สรุปได้ว่า สำหรับเชื้อ BA-019 ปริมาณของอนินทรีย์ไนโตรเจน (แอมโมเนียม ซัลเฟต) และ อินทรีย์ไนโตรเจน (สารสกัดจากยีสต์) ที่เหมาะสม เท่ากับ 1 และ 0.10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากการศึกษาลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-109 พบว่า มีการสร้างสปอร์ โดยการสร้างสปอร์เป็นกระบวนการอยู่รอดของจุลินทรีย์ (survival mechanism)(Scholz และคณะ, 1995) โดย PHB ที่สร้าง และสะสม ในช่วงสิ้นสุดการเจริญแบบทวีคูณจะถูกนำไปใช้ เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในกระบวนการสร้างสปอร์ (Slepecky และ Law, 1961 ; Kominek และ Haivorson, 1965) Schloz และคณะ (1995) ได้เสนอถึง การถ่าย เชื้อ *B.thuringenesis* ลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อที่สร้าง และสะสม PHB ก่อนกระบวนการ สร้างสปอร์จะเกิดขึ้น พบว่า เมื่อสปอร์เกิดขึ้น อัตราการเจริญของเชื้อจะลดลง ภายหลัง ชั่วโมงที่ 17 ซึ่งเป็นช่วงที่มีการเจริญแบบทวีคูณของเชื้อดังกล่าว จากผลการวิจัยนี้ เมื่อเลี้ยงเชื้อ BA-019 ในอาหารที่มีกากน้ำตาลปริมาณ 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนจำกัด เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เชื้อสร้าง และสะสม PHB ได้ปริมาณสูงสุด ในชั่วโมงที่ 24

ซึ่งเป็นช่วงที่มีการเจริญแบบทวีคูณ และค่อยๆ ลดลง ตามลำดับ ภายหลังชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป เมื่อตรวจสอบรูปร่างแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า มีการสร้างสปอร์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 30 ซึ่งในขณะที่ตรวจพบการสร้างสปอร์อย่างต่อเนื่อง ปริมาณของพอลีเมอร์มีการลดลงอย่างมาก ดังแสดงไว้ในรูปที่ 22 ของผลวิจัย Nakata (1963) ศึกษาเรื่องการผลิต PHB โดยเชื้อ *B.cereus* พบว่า สาเหตุที่ปริมาณของ PHB ลดลง เนื่องมาจากเซลล์จะนำ PHB ที่ได้ไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน ในการสร้างสปอร์ เพื่อให้กระบวนการสร้างสปอร์เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ในงานวิจัยนี้ พบว่า ในช่วงที่มีการสร้าง และสะสม PHB ปริมาณน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดในกากน้ำตาลจะถูกใช้อย่างรวดเร็ว และมีการใช้น้อยลงภายหลังที่เชื้อมีการสร้างสปอร์ โดยมีปริมาณของ น้ำตาลกลูโคส และ น้ำตาลฟรุกโตสเหลืออยู่ในอาหาร เมื่อเลี้ยงจนถึงชั่วโมงที่ 72 และ เนื่องจาก การที่แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 สามารถสร้าง และสะสม PHB ได้ในระยะเวลาสั้น ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน จะถูกนำไปใช้อย่างรวดเร็ว และหมดในชั่วโมงที่ 30 ส่วนปริมาณโปรตีนภายในเซลล์จะมีปริมาณคงเดิม ในช่วงการสร้าง และสะสม PHB เป็นที่น่าสังเกตว่าในเวลาที่มีการสร้างและสะสม PHB ได้ปริมาณสูงสุด ค่าพีเอชจะลดลง จากพีเอชเริ่มต้นประมาณ 6.2 เป็น 5.2 ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

Kominek และ Halvorson (1965) ศึกษาถึงกระบวนการสร้าง และสะสม PHB อะซีโตอิน (acetoin) ในเชื้อ *B.cereus* ซึ่งใช้กรดอะซิติค เป็นแหล่งคาร์บอน โดยการผลิต PHB จะเกิดขึ้น ในช่วงที่เชื้อมีการเจริญแบบทวีคูณ จะมีปริมาณ PHB สูงสุด เมื่อ ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีค่าต่ำสุด เมื่อเทียบกับ ค่าพีเอชที่วัดตลอดการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การสะสม PHB จะเกิดขึ้นอย่างคงที่ โดยปริมาณ PHB จะมีปริมาณมากที่สุดในชั่วโมงก่อนที่กระบวนการสร้างสปอร์จะเกิดขึ้น หลังจากมีการสร้างสปอร์ ปริมาณ PHB จะลดลง และหมดไปเมื่อได้สปอร์ที่สมบูรณ์(mature spore) ซึ่งปรากฏการณ์คล้ายกันนี้ก็พบได้ในงานวิจัยนี้เช่นกัน โดยพบว่า ปริมาณ PHB สูงสุด ในชั่วโมงที่ 24 และมีปริมาณลดลงในชั่วโมงที่ 30 ซึ่งเป็นชั่วโมงที่เริ่มมีการสร้างสปอร์ โดยที่เชื้อสายพันธุ์นี้ สร้างสปอร์ที่สมบูรณ์ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ ณ เวลานั้น พบว่า ปริมาณ PHB ลดลงอย่างมาก

ส่วนในการศึกษาถึง ภาวะแวดล้อมบางประการ ที่มีผลต่อการเติบโต และการสร้าง PHB ได้แก่ ค่าพีเอช และอุณหภูมิ จากผลวิจัยนี้ พบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการสร้างและสะสม

PHB ของเชื้อเท่ากับ 6 (ได้ PHB เท่ากับ 29.79 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ชั่วโมงที่ 24) ส่วนเมื่อค่าพีเอชสูงกว่า 6 ได้แก่ 7 และ 8 ปริมาณ PHB ลดลง (26.29 และ 25.79 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ที่ชั่วโมงที่ 24) Kominek และ Halvorson (1965) และ Nakata (1963) ได้ศึกษาและรายงานถึง ผลของพีเอชที่มีต่อการสร้าง และสะสม PHB ของเชื้อ *B.cereus* T พบว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วงประมาณ 6.4 และที่ระดับพีเอชสูงกว่า 6.4 ปริมาณ PHB ที่สะสมจะมีปริมาณลดลง จากงานวิจัยนี้ ได้ผลใกล้เคียงกับ งานวิจัยของ Nakata(1963) โดยพบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอช เท่ากับ 5 และ 6 ในชั่วโมงที่ 24 จะมีปริมาณ PHB มากกว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอช เท่ากับ 7 และ 8 ในเวลาเดียวกัน อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) ได้รายงานถึง ปริมาณ PHB ที่ได้จากการสร้างของเชื้อ *Alcaligenes* sp.A-04 ในระดับขวดเขย่า พบว่า ค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม เท่ากับ 7.0 และในงานวิจัยของ ชนัญ ผลประไพ (2537) ซึ่งรายงานถึง ปริมาณ PHB ที่สร้างและสะสม โดยใช้เชื้อสายพันธุ์เดียวกัน กับของ อรุณ เมื่อเปรียบเทียบ ภาวะที่มีการควบคุม และไม่ควบคุมพีเอช ในการเลี้ยงเชื้อในระดับถังหมัก พบว่า ภาวะที่มีการควบคุมพีเอชจะให้ปริมาณ PHB ที่มากกว่า ดังนั้นในการศึกษาวิจัยต่อไป จึงน่าจะมีการศึกษาเปรียบเทียบการผลิต PHB โดยเชื้อ BA-019 ในภาวะที่มีการควบคุม และไม่ควบคุมพีเอช ตลอดระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ

ส่วนผลการวิจัยที่ศึกษาถึง อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างและสะสม PHB เท่ากับ 30 °ซ อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อ สารที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์โดยเฉพาะโปรตีน และไขมัน โดยที่อุณหภูมิต่างๆ ปริมาณ PHB ที่เชื้อสร้างและสะสมจะมีปริมาณมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับ สารอาหารที่ใช้และชนิดของจุลินทรีย์ ในจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน แต่เลี้ยงที่อุณหภูมิต่างกัน ปริมาณสารที่ผลิตได้จะมีปริมาณต่างกัน การสังเคราะห์ PHB ซึ่งเป็นสารไขมันไม่อิ่มตัว เมื่ออุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น ปริมาณของไขมันที่ผลิตได้จะลดลง (Asselineau, 1966) ดังจะเห็นได้จากการที่เปอร์เซนต์ PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งลดลง เมื่ออุณหภูมิของเชื้อเพิ่มขึ้น จาก 30 °ซ เป็น 37 °ซ ในชั่วโมงที่ 24 ปริมาณของ PHB จะลดลงจาก 31.05 เป็นเท่ากับ 24.89 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และที่อุณหภูมิ 37 °ซ ปริมาณ PHB จะลดลง อย่างรวดเร็ว จากปริมาณ 13.78 ในชั่วโมงที่ 36 ลดลง เหลือเพียง 5.25 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

ในชั่วโมงที่ 48 อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) ได้ศึกษาถึง ผลของอุณหภูมิที่มีต่อปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ จากเชื้อ *Alcaligenes* sp.A-04 พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต เท่ากับ 30 °ซ ผลการวิจัยนี้ ใช้เชื้อสายพันธุ์ BA-019 ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิต PHB เท่ากับ 30 °ซ เช่นกัน

เมื่อสกัดสารผลิตภัณฑ์ออกจากเซลล์ และนำมาผ่านการทำให้บริสุทธิ์ จากการสังเกตแผ่นฟิล์มที่ได้มีลักษณะสีขาว และเปราะง่าย การตรวจสอบด้วยวิธี TLC GC และ IR spectrophotometry และ NMR spectroscopy ทำให้ทราบว่า สารผลิตภัณฑ์เป็น PHB ที่มีหน่วยย่อยคือ 3HB ต่อกันเป็นสายยาว เป็นพอลีเอสเทอร์ที่มีหมู่คาร์บอนิล (จาก ^{13}C NMR spectroscopy และ IR spectrophotometry) และมีหมู่เมทธิล หมู่เมทธีน และหมู่เมทธิลีน (จาก ^{1}H NMR spectroscopy) ซึ่งสอดคล้องกับที่ศึกษาโดย Doi และคณะ(1986) Wakisaka และคณะ(1982) และ Wallen และ Rohweller(1974) และเมื่อศึกษาถึงธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจนซึ่งเป็นธาตุองค์ประกอบของ PHB เปรียบเทียบระหว่างสารผลิตภัณฑ์ ที่สกัดจากเชื้อ BA-019 และ จาก PHB มาตรฐาน พบว่า มีค่าแตกต่างกันน้อยมาก และ ปริมาณที่ได้ใกล้เคียงกับ ปริมาณที่ได้จาก PHB ที่สกัดจาก *B.thuringenesis* ซึ่งรายงานโดย Wakisaka และคณะ(1982) รวมทั้งใกล้เคียงกับ PHB ที่สกัดได้จาก *Bacillus megaterium* (Schlegel และคณะ, 1961)ด้วย แสดงว่า พอลีเอสเทอร์ ที่แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 สร้างขึ้นเป็นสาร PHB

ในการศึกษาถึงจุดหลอมเหลวของสารผลิตภัณฑ์ และ PHB มาตรฐานซึ่งสกัดมาจากเชื้อ *A.eutrophus* พบว่า มีค่าใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 174 °ซ ซึ่งใกล้เคียงกับจุดหลอมเหลวของ PHB ที่สกัดได้จากเชื้อ *B.thuringenesis* strain B-43-D-e ที่ทำการศึกษาโดย Wakisaka และคณะ (1982) ซึ่งอยู่ในช่วง 170-171 °ซ และใกล้เคียงกับ PHB มาตรฐานที่ได้จากบริษัท ICI ซึ่งอยู่ในช่วง 165-178 °ซ (Owen และ Heinzel, 1991) ส่วนค่า T_gของสารผลิตภัณฑ์จากเชื้อ BA-019 (3.9 °ซ) และจาก PHB มาตรฐาน (3.4 °ซ) มีค่าใกล้เคียงกัน และ ใกล้เคียงกับค่า T_g ของ PHB ที่สกัดได้จาก *A.eutrophus* ซึ่งศึกษาโดย Doi และ Abe (1994) ซึ่งเท่ากับ 3.0 °ซ นี้ เป็นค่าที่แสดงว่า พอลีเมอร์นี้มีโครงสร้างเป็นพอลีเมอร์อสัณฐาน (amorphus) หรือ เป็นพอลีเมอร์ที่ไม่มีความเป็นผลึก

ค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (M_w) ของ PHB จะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ วิธีการสกัดแยก รวมทั้งภาวะของการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ ปริมาณสารอาหารที่จำเป็นต่อสร้างและสะสม PHB (Ballard และคณะ, 1987) Hahn และคณะ(1995) ศึกษาถึงค่า M_wของ PHB ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* ที่มีปริมาณลดลง เมื่อสกัด PHB โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ปริมาณ 30 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ร่วมกับ สารคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) Taidi และคณะ (1993) ศึกษาถึงผลของชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน ที่มีผลต่อ M_w ของ PHB ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Methylobacterium extorquens* พบว่า เมื่อเปรียบเทียบในอาหารที่มีโซเดียมซัคซิเนท และ เมทธานอล เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อ *Methylobacterium extorquens* จะผลิต PHB ที่มี M_w สูงในอาหารที่มีโซเดียมซัคซิเนท เป็นแหล่งคาร์บอน คือเท่ากับ $1.7x10^6$ มากกว่า M_w ของ PHB ที่ได้จากการเลี้ยงในเมทธานอล Daniel และคณะ (1992) ได้ทำการศึกษาผลของการจำกัดสารอาหาร ได้แก่ แอมโมเนียม แมกนีเซียม และฟอสเฟต ที่มีต่อ M_w ของ PHB ซึ่งผลิตได้จากเชื้อ *Pseudomonas* 135 พบว่า M_w ของ PHB ที่ได้จากการจำกัดแอมโมเนียมจะมีปริมากมากที่สุด คือเท่ากับ $3.7x10^5$ รองลงมา คือที่ได้จากการจำกัดฟอสเฟต คือเท่ากับ $3.1x10^5$ และที่ได้จากการจำกัดแมกนีเซียม คือเท่ากับ $2.5x10^5$ ตามลำดับ ในปี 1994 Yoo และ Yeom ได้ทำการศึกษาถึงผลของภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีต่อ M_w ของ PHB ที่ผลิตจากเชื้อ *Alcaligenes* K-912 โดยพบว่าจะมีค่าแปรผันตามอุณหภูมิ อยู่ในช่วงตั้งแต่ $3.8x10^5$ จนถึง $5.5x10^5$ แปรผันตามปริมาณของกลูโคสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน อยู่ในช่วงตั้งแต่ $4x10^5$ จนถึง $6x10^5$ แปรผันตามปริมาณฟอสเฟต อยู่ในช่วงตั้งแต่ $3x10^5$ จนถึง $3.8x10^5$ และแปรผันตามปริมาณกรดอะมิโน อยู่ในช่วงตั้งแต่ $4x10^5$ จนถึง $1x10^6$ และในปีต่อมา ได้ศึกษาถึงผลของพีเอชที่มีต่อ M_w ของ PHB ที่ผลิตจากเชื้อสายพันธุ์เดียวกันนี้ พบว่า เมื่อพีเอชสูงขึ้น ค่า M_w ของ PHB จะมีค่าเพิ่มขึ้นด้วย อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) ได้ศึกษาหาค่า M_w ของ PHB ที่ผลิตจากเชื้อ *Alcaligenes* sp.A-04 เมื่อเลี้ยงโดยใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้เท่ากับ $4.5x10^5$ และ อัญชนา ศุรติชจร (2537) ซึ่งได้ศึกษาหาค่า M_wของ โคพอลีเมอร์ ได้แก่ P(3HB-82%3HV) และเทอร์พอลีเมอร์ ได้แก่ P(3HB-39%3HV-13%4HB) ที่ผลิตได้จากเชื้อสายพันธุ์เดียวกันกับ ของ อรุณ (2536) โดยมีค่าเท่ากับ $1.301x10^5$ และ $1.348x10^5$ ตามลำดับ Page และ

Quieng (1994) รายงานถึง การที่ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อค่า M_w โดยค่า M_w มีค่าลดลง เมื่อเพิ่มปริมาณของแหล่งคาร์บอน ซึ่งได้ทำการศึกษาถึง M_w ของ PHB ที่ผลิตจากเชื้อ *Azotobacter vinelandii* strain UWD พบว่า ค่า M_w ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีค่าลดลง เมื่อปริมาณของกากน้ำตาลในอาหารเพิ่มขึ้น จากผลการวิจัยนี้ จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GPC พบว่า ค่า M_w ของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเชื้อ BA-019 และ ค่า M_w ของ PHB มาตรฐาน มีค่าเท่ากับ 3.92×10^6 และ 3.27×10^6 ตามลำดับ

การศึกษาเรื่อง การใช้ Tween 80 ซึ่งเป็นสาร dissociating agent เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และ เป็นที่ทราบกันว่า สารนี้ทำหน้าที่เป็น emulsifier หรือ surfactant หรือ detergent จากผลงานวิจัยของ Vignolo และคณะ (1995) ที่ได้ศึกษาถึงการผลิต แลคโตซิน (lactocin) โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* CRL 705 ซึ่งผลิตสารได้ปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อใส่ Tween 80 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาผลของการใส่สาร dissociating agent ที่มีต่อปริมาณ PHB คือ Tween 80 ในปริมาณตั้งแต่ 0.5 จนถึง 4.0 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และ SDS ในปริมาณ 0.5 และ 1.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงในอาหาร MSM โดยมีชุดควบคุมเป็นอาหาร MSM ที่ไม่มีการเติมสารทั้งสองลงไป ได้พบว่า ในอาหารที่ใส่ Tween 80 ปริมาณ 2.5 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) สามารถช่วยเพิ่มการสร้าง และสะสม PHB ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ทำให้ได้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่ได้จากอาหารชุดควบคุม ซึ่งไม่มีการเติม Tween 80 ซึ่งได้เท่ากับ 33.60 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในเวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และ เพิ่มขึ้นสูงถึง 47.48 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ชั่วโมงที่ 36 เมื่อเพิ่มปริมาณของ Tween 80 ให้มากกว่า 2.5 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่า ปริมาณ PHB ที่ได้ลดลงเล็กน้อย แต่ยังมีปริมาณที่มากกว่าชุดควบคุม ส่วนในอาหารที่ใส่ SDS ทุกความเข้มข้น เชื้อจะสร้าง PHB ได้น้อยกว่าปริมาณ PHB ที่ได้จากอาหารชุดควบคุม คือได้เพียง 20 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในเวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งกลไกในเรื่องนี้ ยังไม่อาจหาคำอธิบายได้ชัดเจนว่า เป็นเพราะสาเหตุใด อาจตั้งข้อสันนิษฐานไว้ หลายประการ ได้แก่ ประการที่ 1 จากการที่ Tween 80 มีคุณสมบัติเป็น surfactant อาจเป็นไปได้ที่

Tween 80 สามารถที่จะลดแรงตึงผิว (surface tension) ของผิวเซลล์ (cell membrane) เพิ่มการยอมให้สารผ่าน (permeability) ของผิวเซลล์ ทำให้มีการแพร่ของแกรนูล PHB ออกนอกเซลล์ และ ประการที่ 2 คือ อาจเป็นไปได้ที่ในอาหาร MSM จะมีสารอาหารบางส่วน (จากกากน้ำตาล) ซึ่งละลายน้ำได้ไม่ดี ทำให้จุลินทรีย์ มีการสัมผัสกับสารอาหารเหล่านั้นไม่ดีเท่าที่ควร เมื่อใส่ Tween 80 ลงไป Tween 80 เป็นสาร emulsifier มีโครงสร้างประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ไม่มีขั้ว เป็นส่วนที่ไม่สามารถละลายน้ำ ได้แก่ สายไฮโดรคาร์บอนที่มีปลายหมู่เป็นกรดไขมัน และ ส่วนที่มีขั้ว เป็นส่วนที่สามารถละลายน้ำได้ ได้แก่ ส่วนที่เป็นกรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น โดย Tween 80 จะเข้าไปจับกับส่วนที่ไม่ละลายน้ำของสารบางอย่างที่อาจจะละลายน้ำไม่ดีนั้น โดยใช้ด้านที่ไม่มีขั้ว เข้าไปจับไว้ ทำให้สารนั้นสามารถละลายน้ำได้ จุลินทรีย์จึงสามารถสัมผัส กับสารอาหารนั้น ได้มากขึ้น หรือ ประการสุดท้าย อาจเนื่องจาก Tween 80 ซึ่งมีสมบัติเป็น (nonionic) detergent อาจไปทำการเปลี่ยนแปลง (modify) องค์ประกอบ ของผิวเซลล์แล้วทำให้สารอาหาร ผ่านเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น ทำให้มีการสร้าง PHB ได้เพิ่มขึ้น ส่วน SDS ซึ่งจัดเป็น anionic detergent นั้น แม้ใช้ความเข้มข้นเพียง 0.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ก็มีผลทำให้ปริมาณ PHB ลดลง อาจกล่าวโดยสรุปว่า เนื่องจาก SDS มีผลให้ผิวเซลล์เกิดช่องเปิด ทำให้สารภายในเซลล์ไหลรั่วออกมา จึงมีผลให้การสร้าง PHB ลดลง ดังนั้น จึงอาจเป็นไปได้ว่า ปริมาณ PHB อาจจะเพิ่มขึ้น เนื่องจากการใส่ Tween 80 ลงในสารอาหาร จากข้อสันนิษฐานดังที่กล่าวมา ซึ่งควรจะมีการวิจัยเรื่องนี้ต่อไป

สรุปผลของงานวิจัย

1.แยก(isolation) และ คัดเลือก (screening)ได้แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ซึ่งสามารถสร้าง และสะสม PHB ได้ ในปริมาณ 13.21 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน

2.เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ที่คัดเลือกมาใช้ในงานวิจัยนี้ ได้ถูกจำแนกชนิดว่าเป็นเชื้อในกลุ่ม *Bacillus*

3.สารผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ได้รับการตรวจลักษณะทั้งสมบัติทางกายภาพ และทางเคมี ว่าเป็น PHB โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 3.92×10^6 ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของ PHB มาตรฐาน ที่สกัดได้จากเชื้อ *A.eutrophus*

4.แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการสร้างและสะสม PHB เป็น แหล่งคาร์บอนราคาถูก ได้แก่ กากน้ำตาลปริมาณ 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งแบคทีเรียสร้าง และสะสม PHB ได้เพิ่มขึ้น ในระยะเวลาสั้น คือ ในเวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ได้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นเป็น 31.84 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

5.ภาวะทางกายภาพ สำหรับการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ที่เหมาะสม ต่อการสร้าง PHB คือ อุณหภูมิ 30 °ซ และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6

6.การจำกัดปริมาณไนโตรเจน (แอมโมเนียมซัลเฟต) ฟอสเฟต แมกนีเซียม และ โพแทสเซียม ไม่มีผลในการช่วยเพิ่มปริมาณ PHB ที่สร้าง โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019

7.การเติมอินทรีย์ไนโตรเจน (โดยเพิ่มปริมาณด้วย) เพื่อให้เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงแหล่งเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อแทนที่อินทรีย์ไนโตรเจน และอินทรีย์ไนโตรเจน ซึ่งใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนร่วมกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม ไม่มีผลในการเพิ่มปริมาณ PHB ที่สร้างโดย แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019

8.การเติม Tween 80 ซึ่งเป็นสาร dissociating agent ปริมาณ 2.5 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลให้แบคทีเรีย มีการสร้าง PHB ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นมากถึง 47.48 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 36 ของการเลี้ยงเชื้อ

สรุปว่า งานวิจัยนี้สามารถคัดเลือกได้แบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถสร้างสาร PHB

และ จากการศึกษาปัจจัยต่างๆ ในการสร้าง และสะสมสารผลิตภัณฑ์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ทำให้ได้ PHB เพิ่มขึ้นจากเริ่มต้นปริมาณ 13.21 เป็น 47.48 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

สรุปจุดเด่นที่น่าสนใจของงานวิจัยนี้

แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ซึ่งแยกได้ใหม่ และใช้ในงานวิจัยนี้มีความสามารถสร้างและสะสม PHB ได้ในระยะเวลาสั้น โดยได้ปริมาณ PHB สูงสุด ในเวลาเพียง 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และสามารถใช้กากน้ำตาล ซึ่งเป็นส่วนเหลือทิ้งจากโรงงานน้ำตาล ซึ่งจัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการที่จะนำมาใช้ผลิต PHB ในระดับขยายส่วน เพราะสามารถลดต้นทุนการผลิตในส่วนของราคาอาหารเลี้ยงเชื้อลงได้เป็นอย่างมาก

ปริมาณ PHB ที่แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ผลิตได้โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อในงานวิจัยนี้ จัดว่าได้ในปริมาณที่ค่อนข้างสูงมากพอควร สำหรับการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่า คือ ได้ปริมาณเท่ากับ 47.48 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อกลุ่ม *Bacillus* ซึ่งมีรูปแบบการเจริญ และ การสร้างสปอร์ ใกล้เคียงกัน แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ผลิต PHB ได้ปริมาณมากกว่า โดยงานวิจัยล่าสุด ในปี 1994 Kofronova และ คณะ รายงานว่า เชื้อ *Bacillus megaterium* ผลิต PHB สูงสุด ได้เท่ากับ 35-45 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จึงเห็นได้ว่า PHB ที่แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ผลิตได้มีปริมาณสูงกว่า รวมทั้ง การที่ในงานวิจัยดังกล่าว ต้องใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งจัดว่าเป็นสารอาหารที่มีราคาสูงกว่ากากน้ำตาลมาก จึงมีต้นทุนการผลิตสูงกว่าอีกประการหนึ่ง ถ้าได้มีการวิจัยต่อ โดยเลี้ยงเชื้อ BA-019 ในถังหมัก ซึ่งสามารถวัด และควบคุมตัวแปร และปัจจัยต่างๆ ซึ่งมีผลต่อปริมาณ PHB นอกจากนี้การเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ยังทำให้ได้ปริมาณเซลล์มากขึ้น ย่อมทำให้ปริมาณ PHB รวม มีปริมาณมากขึ้นได้ สรุปว่า ถ้ามีการศึกษาต่อ โดยเลี้ยงเชื้อในภาวะที่ควบคุมปัจจัยต่างๆ ให้เหมาะสมขึ้น เชื้อ BA-019 ก็น่าจะมีการผลิต PHB ได้ปริมาณสูงยิ่งขึ้น

แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ซึ่งได้ถูกจำแนกชนิดแล้วว่า อาจจะเป็น *Bacillus* ซึ่งเซลล์มีขนาดใหญ่(2.5-6μm)กว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานว่า สามารถผลิต PHB ได้

ก็จะสามารถสะสม PHB ได้ปริมาณมากกว่าเซลล์ที่มีขนาดเล็กกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นด้วย คือ โดยทั่วไป แกรนูลของ PHB จะมีขนาดประมาณ 0.3-1.0 μm ส่วนแกรนูลของ *Bacillus* มีขนาดประมาณ 0.88-1.56 μm (Kofronova และคณะ, 1994)

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิต PHB ที่มีรายงานการวิจัยไว้ เป็นเชื้อกลายพันธุ์ (mutant) เช่น *Azotobacter vinelandii* สายพันธุ์ UWD จึงสามารถใช้กากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ดังนั้นเชื้อสายพันธุ์ BA-019 ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์ธรรมชาติ (wild type) ถ้านำมาทำการกลายพันธุ์ ก็อาจจะใช้กากน้ำตาลได้อย่างมีประสิทธิภาพ และ อาจสามารถผลิต PHB ได้ปริมาณสูงยิ่งขึ้นอีก