บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

สรุป

4.1 การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนด็ม

เมื่อเทียบเคียงแบคทีเรียสายพันธุ์ ES16, N20 และ U7 ตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Staley *et al*., 1989) และเทคนิค 16S rDNA พบว่าสายพันธุ์ ES16 เทียบเคียงได้เป็น *Rhodobacter sphaeroides* (100%) ส่วนสายพันธุ์ N20 และ U7 เทียบเคียงได้เป็น *Rhodobacter sphaeroides* (99%)

4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์กลายทนเค็มที่มีคุณสมบัติในการผลิตโคพอลิเมอร์

ผลของความเข้มข้นของกรดวาเลอริก

จากการเติมกรดวาเลอริก 0, 20, 40 และ 80 mM พบว่า *Rhodobacter sphaeroides* N20 มีปริมาณ HB ของพอลิเมอร์กลุ่ม PHA โดยคิดสัดส่วนในรูป mol % เป็น 100, 20.7, 17.2 และ 30.1% และมี HV เท่ากับ 79.3, 82.8 และ 69.9% ตามลำดับ ส่วน *Rhodobacter sphaeroides* U7 ให้ HB เท่ากับ 100, 20.5, 15.2 และ 22.8% และ HV เท่ากับ 0, 79.5, 84.7 และ77.2%

ผลของความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิก

จากการเติมกรดโพรพิโอนิก 0, 20, 40 และ 80 mM พบว่า *Rhodobacter sphaeroides* N20 มี HB คิดเป็นสัดส่วนในรูป mol % เท่ากับ 100, 86.2, 82.7 และ 78.9% ขณะที่พบ HV เท่ากับ 0, 13.8, 17.2 และ 21.1 ตามลำดับ ส่วน *Rhodobacter sphaeroides* U7 ให้ HB เท่ากับ 100, 80.4, 80.8 และ 79.3% และ HV เท่ากับ 0, 19.6, 19.1 และ 20.8% ดังนั้นจึงคัดเลือกสายพันธุ์ U7 เนื่องจากให้ค่า mol % ของ HV ที่สูงกว่า

4.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต PHA จาก *Rhodobacter sphaeroides* U7

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเป็นการดัดแปลงสูตรอาหารกลูตาเมท-อะซิเตท โดยมีการเติมกรดวาเลอริก 40 มิลลิโมลาร์ ไม่จำเป็นต้องเติมแอมโมเนียมซัลเฟต และปริมาณยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร ในขณะที่สภาวะสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสม คือ ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะการเลี้ยงแบบไร้อากาศ-มีแสง (3,000 ลักซ์) ให้อากาศในอัตรา 1.0 vvm ส่งเสริมการเจริญ ส่วนการให้อากาศ 0.5 vvm ส่งเสริมการผลิต PHA ร่วมกับการกวน (200 รอบต่อนาที) และสกัดพอลิเมอร์จาก lyophilized cell ด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม

4.4 การศึกษาคุณลักษณะของโคพอลิเมอร์

จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบว่าพอลิเมอร์กลุ่ม PHA ที่สกัดได้จาก *Rhodobacter sphaeroides* U7 มีองค์ประกอบย่อย 2 หน่วยคือ hydroxybutyrate (HB) กับ hydroxyvalerate (HV) และจากการวิเคราะห์ด้วย DSC พบว่ามีอุณหภูมิหลอมเหลวและอุณหภูมิแข็งตัวของผลึก เท่ากับ 166.033 และ 121.033 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เมื่อนำพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ ศึกษาสเปคตรัมพบว่ามีความสอดคล้องกับสเปคตรัมของสารประกอบ PHBV ทั้งการวิเคราะห์ด้วย X-ray diffractometer, FT-IR และ NMR โดยพบว่า PHBV จาก *R. sphaeroides* U7 มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 200,000-500,000 ดาลตัน และพบว่าผลึกที่เกิดขึ้นจากการตกตะกอนด้วยเฮกเซนจะมีลักษณะทรงกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7-1.0 μm เมื่อเตรียมในคลอโรฟอร์มซึ่งไม่ผ่านขั้นตอนการระเหยคลอโรฟอร์ม (เพื่อลดปริมาณตัวทำละลาย)

ข้อเสนอแนะ

1. เพื่อเป็นการเพิ่มศักยภาพในการผลิตโคพอลิเมอร์ของเชื้อ ควรปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรม ควรหลีกเลี่ยงการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยการกลายพันธุ์แบบสุ่ม เพื่อหลีกเลี่ยงและลดปัญหาความไม่คงตัวของเชื้อหรือการสูญเสียความสามารถในการผลิต
2. เนื่องจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodobacter sphaeroides* เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเป็นกลาง ควรทำการควบคุมพีเอชให้คงที่ตลอดการเลี้ยง
3. การพัฒนาการหมักเพื่อผลิตโคพอลิเมอร์ นอกจากจะเลี้ยงเชื้อแบบกะหรือกึ่งกะ สามารถทำแบบไม่ต่อเนื่องสองขั้นตอน, แบบกึ่งต่อเนื่อง, แบบต่อเนื่องขั้นตอนเดียว และแบบต่อเนื่องสองขั้นตอน
4. การผลิตโคพอลิเมอร์ ควรใช้แหล่งคาร์บอนจำเพาะที่ส่งเสริมการผลิตมอนอเมอร์ ดีกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนทั่วไป เช่น น้ำตาล เพื่อหลีกเลี่ยงการส่งเสริมการผลิตเซลล์