บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีของ *Bacillus* sp. BA-019

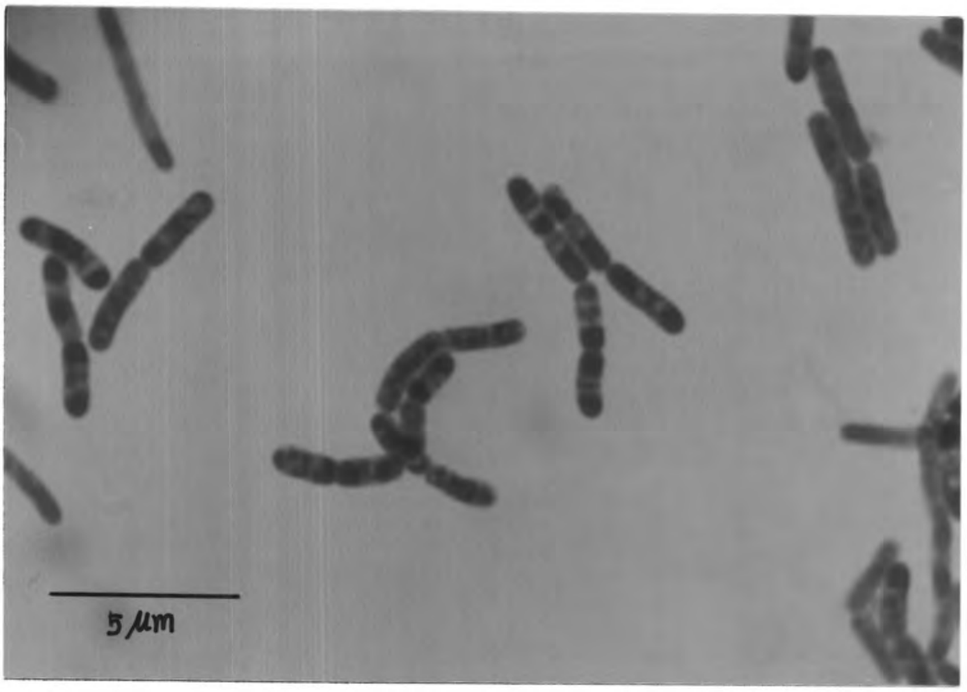
จากการศึกษาโดยผู้วิจัยคณะนี้ รัตนศิริ มุทิตากุล (2538) ได้แยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ 30 สายพันธุ์จากแหล่งธรรมชาติ เพื่อหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสม PHB พบว่า จุลินทรีย์สายพันธุ์ BA-019 สามารถผลิต PHB ได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่น และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นจัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* จึงเรียกแบคทีเรียนี้ว่า *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีขนาดใหญ่ใกล้เคียงกับ *Bacillus megaterium* และเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่า *B. megaterium* เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHB ได้ (Bergey และคณะ, 1986) จึงศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีเพิ่มเติมเพื่อให้ทราบว่าเป็น *Bacillus megaterium* หรือไม่

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีของ *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งเลี้ยงในอาหารนิวเตรียนท์อายุ 24 ชั่วโมง พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 มีลักษณะดังนี้ (รูปที่ 9(ก)) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะเป็นท่อนขนาดความกว้าง 1.1 ถึง 1.5 ไมโครเมตร ความยาว 3 ถึง 5 ไมโครเมตร สามารถสร้างสปอร์รูปรีภายในเซลล์อยู่ที่บริเวณกลางถึงปลายเซลล์ โดยเซลล์ไม่โป่งออก (รูปที่ 9(ข)) มีเอนไซมคาตาเลส สามารถสร้างกรดจากการใช้ไซโลส และอะราบิโนสได้ แต่ไม่สามารถสร้างกรดจากการใช้แมนนิทอล ไม่เจริญในภาวะที่ไม่มีอากาศ สามารถใช้ซิเตรตได้ ให้ผลลบกับการทดสอบ Voges-Proskauer (VP) ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และ 50 องศาเซลเซียสขึ้นไป สามารถย่อยเจลาตินได้ สามารถย่อยแป้งได้ (เฉพาะบริเวณใต้โคโลนี) เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์แต่เจริญได้ช้า ดังแสดงในตารางที่ 2 นอกจากนั้นยังพบว่า สามารถสร้างแคบซูล ไม่รีดิวซ์ไนเตรต และสามารถย่อยโปรตีนได้ เมื่อเปรียบเทียบกับ *B. megaterium* พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีใกล้เคียงกันมาก ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า *Bacillus* sp. BA-019 มีลักษณะคล้ายกับ *Bacillus megaterium*

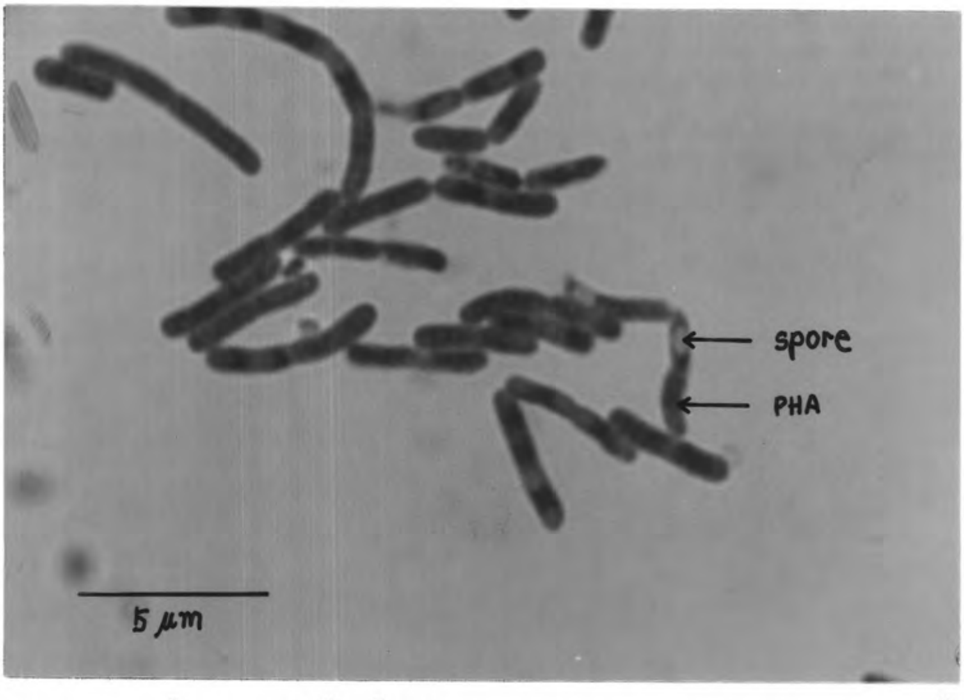
ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี ของ *Bacillus* sp. BA-019 เปรียบเทียบกับ *Bacillus megaterium*

Characteristics	*B.megaterium*	BA-019	Characteristics	*B.megaterium*	BA-019
Gram staining	+	+	unstained globules	+	+
cell shape	rod	rod	in the protoplasm		
cell size- width(μm)	1.2 - 1.5	1.1 - 1.5	alkali on citrate-	+	+
-length(μm)	2 - 5	3 - 5	salt agar		
spore formation	+	+	VP- reaction	-	-
spore shape	ellipsoidal	ellipsoidal	growth at 5^{0}c	d	-
distends sporan-	-	-	growth at 10^{0}c	+	+
-gium distinctly			growth at 25^{0}c	+	+
dominant position	central	subterminal	growth at 30^{0}c	+	+
catalase test	+	+	growth at 37^{0}c	+	+
acid from glucose	+	+	growth at 50^{0}c	-	-
gas from glucose	-	-	growth at 60^{0}c	-	-
acid from			gelatin liquefaction	+	+
D-manitol	d	-	hydrolysis of starch	+	+
D-xylose	d	+	growth at NaCl 5%	ND	+
L-arabinose	d	+	growth at NaCl 7%	d	+
anaerobic growth	-	-	growth at NaCl 10%	ND	-

+ = 90% or more of strains positive ; - = 90% or more of strains positive negative ; d = 11-89% of strains are positive; ND = no data available (Bergey และคณะ, 1986)



รูปที่ 9(ก) รูปย้อมสีแกรมของเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 อายุ 18 ชั่วโมง เลี้ยงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (กำลังขยาย 1000 เท่า)



รูปที่ 9 (ข) รูปแสดงการสร้างแกรนูลซึ่งย้อมด้วยสีซูดานแบลคบี (Sudan black B) และการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. BA-019 อายุ 18 ชั่วโมง เลี้ยงบนอาหารแข็งนิวเตรียนต์ (กำลังขยาย 1000 เท่า)

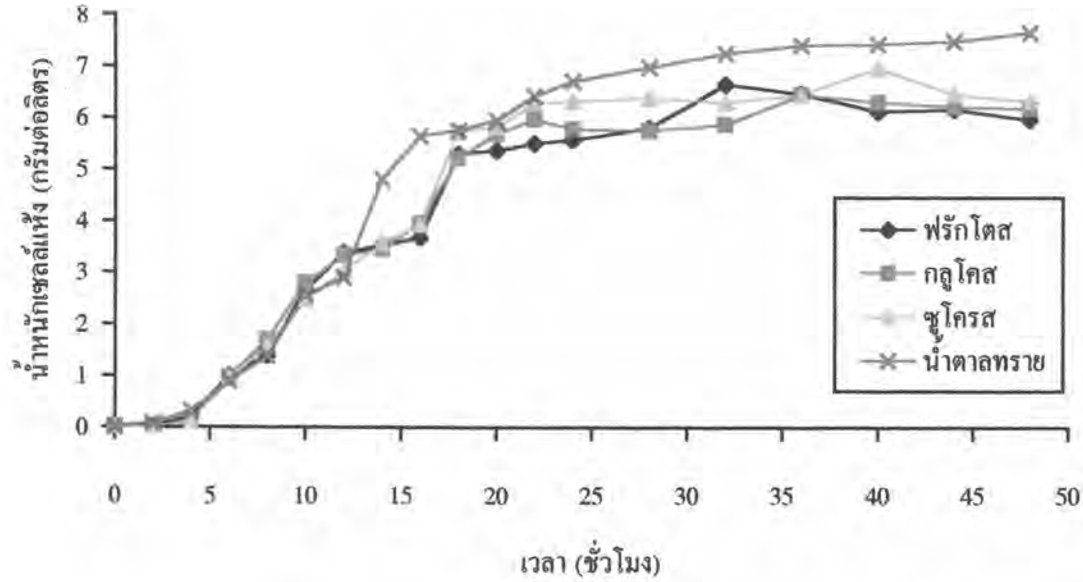
3.2 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ

จากงานวิจัยที่ผ่านมาเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อที่มีฟรักโตส 10 กรัมต่อลิตร ต่อมาพบว่า *Bacillus* sp. BA-019 นี้สามารถเติบโตได้ดีกว่าในอาหารเพื่อการผลิต (MSM) ที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน (รัตนศิริ มุทิตากุล, 2538 และ พิสิษฐ คงกำเนิด, 2540) จึงมีแนวคิดว่าควรศึกษาหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อเพื่อให้ได้กล้าเชื้อปริมาณมาก เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการผลิตต่อไป

ถ่ายหัวเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 จากอาหารลาดเอียงซึ่งบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง กระจายในสารละลายนอร์มอลซาไลน์ (โซเดียมคลอไรด์ 0.85% น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรได้เท่ากับ 0.5 ใส่ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร แหล่งคาร์บอนที่ศึกษาได้แก่ ฟรักโตส กลูโคส ซูโครส และน้ำตาลทราย (ซึ่งมีซูโครสเป็นองค์ประกอบหลักประมาณ 94 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความบริสุทธิ์น้อยกว่าซูโครสเกรดวิเคราะห์ ซึ่งได้วิเคราะห์โดยวิธี HPLC ดังแสดงในภาคผนวก ค) อย่างใดอย่างหนึ่ง ความเข้มข้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร พบว่า รูปแบบการเติบโตของ *Bacillus sp.* BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อที่เติมฟรักโตส กลูโคส ซูโครส และน้ำตาลทราย ให้ผลการเติบโตที่ใกล้เคียงกัน คือ ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 6.64 6.44 6.96 และ 7.64 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเลี้ยงในน้ำตาลทรายมีแนวโน้มการเติบโตสูงกว่า ดังตารางที่ 3 และรูปที่ 10 จากผลการทดลองนี้ และเนื่องจากน้ำตาลทรายมีราคาถูกกว่าซูโครสเกรดวิเคราะห์มากจึงเลือกน้ำตาลทราย (10 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ

ตารางที่ 3 การเติบโตของ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อที่มีฟรักโตส กลูโคส ซูโครส หรือน้ำตาลทราย (10 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

ชั่วโมงที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	ฟรักโตส	กลูโคส	ซูโครส	น้ำตาลทราย
0	0.005	0.004	0.003	0.007
2	0.01	0.01	0.01	0.08
4	0.22	0.12	0.12	0.32
6	1.00	0.98	0.96	0.90
8	1.39	1.70	1.57	1.39
10	2.68	2.79	2.48	2.57
12	3.38	3.35	3.01	2.90
14	3.52	3.45	3.56	4.81
16	3.68	3.95	3.92	5.65
18	5.29	5.21	5.72	5.76
20	5.36	5.69	5.82	5.95
22	5.50	5.97	6.28	6.42
24	5.56	5.78	6.31	6.70
28	5.80	5.74	6.38	6.98
32	**6.64**	5.86	6.29	7.24
36	6.46	**6.44**	6.44	7.40
40	6.11	6.29	**6.96**	7.42
44	6.16	6.21	6.44	7.47
48	5.95	6.17	6.31	**7.64**



รูปที่ 10 การเติบโตของ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อที่มีฟรักโตส กลูโคส ซูโครส หรือน้ำตาลทราย (10 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

3.3 ผลของแหล่งคาร์บอนเดี่ยวชนิดต่างๆ ต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ และปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019

ชนิดของพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นสำคัญ ดังที่กล่าวแล้วในบทนำว่าพอลิเมอร์มี 2 กลุ่มใหญ่ คือ โฮโมพอลิเมอร์และเฮเทอร์โรพอลิเมอร์ ในงานวิจัยนี้ ต้องการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-*co*-3HV) ซึ่งจัดเป็นเฮเทอร์โรพอลิเมอร์ชนิดหนึ่ง ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 2 ชนิด ได้แก่ 3HB และ 3HV ส่วนใหญ่จุลินทรีย์จำเป็นต้องมีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์โมโนเมอร์แต่ละชนิด เช่น การสังเคราะห์โมโนเมอร์ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3-hydroxybutyrate หรือ 3HB) แหล่งคาร์บอนได้แก่น้ำตาล กรดบิวทิริกหรืออะซิเตต แหล่งคาร์บอนสำหรับโมโนเมอร์ของ 3-ไฮดรอกวาเลอเรต (3-hydroxyvalerate หรือ 3HV) คือ กรดวาเลอริกหรือกรดโพรพิโอนิก ส่วนสารตั้งต้นสำหรับผลิต 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (4-hydroxybutyrate หรือ 4HB) อาจเป็นกรด 4-ไฮดรอกซีบิวทิริก 1,4-บิวเทนไดออล (Doi, 1990) ถ้าจุลินทรีย์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนเดี่ยว เช่น น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวเพื่อผลิตเฮเทอร์โรพอลิเมอร์ได้ จะเป็นข้อได้เปรียบที่สำคัญซึ่งช่วยลดความยุ่งยากในกระบวนการผลิต ลดความเป็นพิษต่อเซลล์อันเนื่องมาจากการใช้กรดบางอย่าง และลดต้นทุนในด้านวัตถุดิบ (Lee S. Y., 1996b; Lee E. Y. และคณะ, 1995) จากการรายงานส่วนมากแบคทีเรีย *Pseudomonas* สามารถผลิตเฮเทอร์โรพอลิเมอร์จากแหล่งคาร์บอนเดี่ยวได้ เช่น *Pseudomonas* sp. EL-2 สามารถใช้กลูโคส ฟรักโตส กลีเซอรอล ซอร์บิทอล อย่างใดอย่างหนึ่ง 1 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนัก และกรดกลูโคนิก กรดโพรพิโอนิก กรดวาเลอริก อย่างใดอย่างหนึ่ง 0.5 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยวผลิตเฮเทอร์โรพอลิเมอร์ประเภท PHBV ได้ (Son และ Lee, 1996) นอกจากนั้นยังมีการศึกษาใน *Agrobacterium sp.* SH-1 และ GW-014 ที่สามารถผลิต PHBV ในอาหารที่มีอะราบิโนส ไซโลส กลูโคส ฟรักโตส แมนนิทอลหรือน้ำตาลทราย และสามารถผลิต 4HB ร่วมอีกด้วยในอาหารที่ใช้ 1,4-บิวเทนไดออล หรือ 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต อย่างใดอย่างหนึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน (Lee E.Y. และคณะ, 1995) การผลิต P(3HB-*co*-3HV) โดย *Alcaligenes* sp. AK201 จากเกลืออัลคาโนเอตที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 2 ถึง 22 อะตอม จากน้ำมันพืชและน้ำมันสัตว์ในปริมาณ 3 กรัมต่อลิตร (Akiyama และคณะ, 1992) การผลิต P(3HB-*co*-3HV) จาก *A.eutrophus* NCIMB 12080 โดยใช้แอลกอฮอล์เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว (Park และคณะ, 1994) การผลิตเฮเทอร์โรพอลิเมอร์ P(3HB-*co*-3HV) โดย *A.eutrophus* H16 สายพันธุ์กลาย R3 จาก ฟรักโตส กลูโคเนต ซัคซิเนต อะซิเตต หรือแลคเตต อย่างใดอย่างหนึ่ง เป็นแหล่งคาร์บอน (Steinbuchel และ Pieper, 1992) มีรายงานโดยหนึ่งในผู้วิจัยคณะนี้ถึง การผลิต

เฮเทอร์โรพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วย 3HB 3HV และ 4HB โดย *Alcaligenes* sp. A-04 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเดี่ยวบางชนิดได้ เช่น จากกรดอินทรีย์ (กรดวาเลอริก กรดบิวทิริกและกรดโพรพิโอนิก) เกลือของกรดอินทรีย์ (โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรตและโซเดียมอะซิเตต) น้ำมันพืช (น้ำมันปาล์ม น้ำมันข้าวโพด น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันเมล็ดทานตะวัน) พอลิไฮดรอกซี (กลีเซอรอล) และแอลกอฮอล์ (เอทานอลและบิวทานอล) (อัญชนา ศุรติขจร, 2537)

ดังนั้นในขั้นตอนแรกนี้ จึงต้องการศึกษาการผลิตเฮเทอร์โรพอลิเมอร์ของ *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเดี่ยวต่างๆ โดยวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของโมโนเมอร์ที่ *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิตได้ โดยนำกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน อายุ 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเซลล์แล้วนำเซลล์ถ่ายลงในอาหารสำหรับการผลิตที่ใช้น้ำมันพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะกอก น้ำมันรำข้าว และน้ำมันเมล็ดทานตะวัน อย่างใดอย่างหนึ่งปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4(ก) แอลกอฮอล์บางชนิด ได้แก่ เมทานอล เอทานอล โพรพานอล 1-บิวทานอล 1,4-บิวเทนไดออล และ 1-ออกทานอล อย่างใดอย่างหนึ่งปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4(ข) เกลือของกรดบางชนิด ได้แก่ โซเดียมอะซิเตต โซเดียม-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต โซเดียมแลกเตต โซเดียมเบนโซเอต อย่างได้อย่างหนึ่งปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 4(ค) และน้ำตาลบางชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว ได้แก่ ไซโลส กลูโคส ฟรักโตส กาแลกโตส มอลโตส แลกโตส น้ำตาลทราย และแมนนิทอล อย่างใดอย่างหนึ่งปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร ดังแสดงผลในตารางที่ 4(ง) และศึกษาการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ เพิ่มปริมาณเป็น 20 กรัมต่อลิตร ผลแสดงในตารางที่ 4(จ) เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 24 นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ชนิดและสัดส่วนของโมโนเมอร์ ปริมาณของพอลิเมอร์ ซึ่งพบว่า *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตโฮโมพอลิเมอร์ PHB เป็นส่วนใหญ่ แต่พบว่าสามารถผลิตเฮเทอร์โรพอลิเมอร์จากแหล่งคาร์บอนเดี่ยวบางชนิดได้ โดยมีโมโนเมอร์ของ 3HB เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ และมีโมโนเมอร์อื่นๆ ได้แก่ 3HV สัดส่วน 0.2 ถึง 13.5 โมลเปอร์เซ็นต์ 4HB สัดส่วน 0 ถึง 3.5 โมลเปอร์เซ็นต์ ส่วน 2HB มีเพียงเล็กน้อย (ในกรณีที่ปริมาณของเฮเทอร์โรพอลิเมอร์ที่ได้ต่ำกว่า 5.0 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งไม่ได้รายงานสัดส่วนของโมโนเมอร์ เนื่องจากถือว่าเป็นสัดส่วนที่ต่ำเกินไป)

ตารางที่ 4(ก) ปริมาณพอลิเมอร์ ชนิดและสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิต ที่ใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว

น้ำมันพืช (10 กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHA (%/นน.)	โมโนเมอร์ (โมล %)			
			2HB	3HB	3HV	4HB
น้ำมันถั่วเหลือง	2.17	0.29	ND	ND	ND	ND
น้ำมันปาล์ม	2.34	1.63	ND	ND	ND	ND
น้ำมันมะกอก	2.57	**5.16**	0	86.3	**13.5**	0.2
น้ำมันรำข้าว	2.51	1.33	ND	ND	ND	ND
เมล็ดทานตะวัน	2.29	0.94	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ ND = ไม่ได้ตรวจหา เนื่องจากปริมาณพอลิเมอร์ต่ำกว่า 5.0 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

%/นน. = เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง หรือ น้ำหนักเป็นกรัมของพอลิเมอร์ต่อ 100 กรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง

ตารางที่ 4(ข) ปริมาณพอลิเมอร์ ชนิดและสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิต ที่ใช้แอลกอฮอล์เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว

แอลกอฮอล์ (10 กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHA (%/นน.)	โมโนเมอร์ (โมล %)			
			2HB	3HB	3HV	4HB
เมทานอล	2.26	0.59	ND	ND	ND	ND
เอทานอล	2.23	0.77	ND	ND	ND	ND
โพรพานอล	2.18	8.93	0	93.8	6.0	0.2
1-บิวทานอล	3.00	9.17	0	86.1	**10.4**	**3.5**
1,4-บิวเทนไดออล	2.79	1.92	ND	ND	ND	ND
1-ออกทานอล	2.29	**12.78**	0	85.8	**13.5**	0.7

การผลิตพอลิเมอร์จาก *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว (ตารางที่ 4(ก)) พบว่า เชื้อสามารถผลิตพอลิเมอร์ได้ปริมาณต่ำ โดยได้ปริมาณพอลิเมอร์สูงสุดเพียง 5.16 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยวโดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จัดเป็นเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-*co*-3HV-*co*-4HB) ซึ่งประกอบด้วย 3HB 86.3 3HV 13.5 และ 4HB 0.2 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อใช้แอลกอฮอล์เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว (ตารางที่ 4(ข)) พบว่า เมื่อใช้โพรพานอล 1-บิวทานอล และ 1-ออกทานอล เชื้อสามารถผลิต P(3HB-*co*-3HV-*co*-4HB) ได้ โดยได้ปริมาณสูงที่สุด เท่ากับ 12.78 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้ 1-ออกทานอลโดยได้สัดส่วน 3HB 3HV และ 4HB เท่ากับ 85.8 13.5 และ 0.7 โมลเปอร์เซ็นต์ น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเมอร์ที่ได้จากการใช้แหล่งคาร์บอนเดี่ยว 2 กลุ่มดังกล่าวยังอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำมาก จึงสรุปได้ว่า น้ำมันพืชและแอลกอฮอล์ไม่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อการผลิต พอลิเมอร์จาก *Bacillus* sp. BA-019

จากการใช้เกลือของกรดอินทรีย์และกรดไขมันเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว ผลการทดลอง (ตารางที่ 4(ค)) พบว่า ได้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเมอร์เพิ่มสูงขึ้นกว่าการใช้แหล่งคาร์บอน 2 กลุ่มแรก โดย *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ของ 3HB และ 3HV ที่มีสัดส่วนของ 3HV สูงสุดคือ 5.6 โมลเปอร์เซ็นต์เมื่อใช้โซเดียมแลกเตตเป็นแหล่งคาร์บอน และสามารถผลิตเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-*co*-3HV-*co*-4HB) ที่มีสัดส่วนของ 3HB 3HV และ 4HB เท่ากับ 97.5 0.4 และ 2.1 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรตเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ P(3HB-*co*-3HV) สูงสุดเท่ากับ 30.01 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในโซเดียมอะซิเตต แต่โคพอลิเมอร์ที่ได้มีสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ต่ำมาก (0.8 โมลเปอร์เซ็นต์) และพบว่าเมื่อใช้โซเดียมเบนโซเอตไม่มีการผลิตเฮเทอร์โรพอลิเมอร์เลย

ส่วนการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ในการผลิตเฮเทอร์โรพอลิเมอร์โดย *Bacillus* sp. BA-019 ผลการใช้น้ำตาลปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร แสดงในตารางที่ 4(ง) พบว่า โดยส่วนใหญ่แล้วน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเมอร์ที่ได้อยู่ในเกณฑ์สูงพอควร และเชื้อสามารถผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-*co*-3HV) และเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-*co*-3HV-*co*-4HB) ได้ โดยสัดส่วนของโมโนเมอร์ส่วนใหญ่เป็น 3HB โมโนเมอร์อื่นมีสัดส่วนต่ำ พบว่า สัดส่วนของ 3HV ได้สูงที่สุดคือ 3.5 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงในน้ำตาลกาแลกโตส ส่วนปริมาณพอลิเมอร์ได้สูงใกล้เคียงกันเมื่อเลี้ยงเชื้อในน้ำตาลหลายชนิด โดยได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในน้ำตาลทรายได้ปริมาณเท่ากับ 22.64 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในกลูโคสได้ปริมาณ 22.62 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

ตารางที่ 4(ค) ปริมาณพอลิเมอร์และสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิต ที่ใช้เกลือของกรดบางชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว

เกลือของกรดบางชนิด (10 กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHA (%/นน.)	โมโนเมอร์ (โมล %)			
			2HB	3HB	3HV	4HB
โซเดียมอะซิเตต	4.41	**30.01**	0	99.2	0.8	0
โซเดียม-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต	4.47	19.94	0	98.7	1.3	0
โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต	3.68	14.41	0	97.5	0.4	**2.1**
โซเดียมแลกเตต	3.47	17.68	0	94.4	**5.6**	0
โซเดียมเบนโซเอต	3.14	0.89	ND	ND	ND	ND

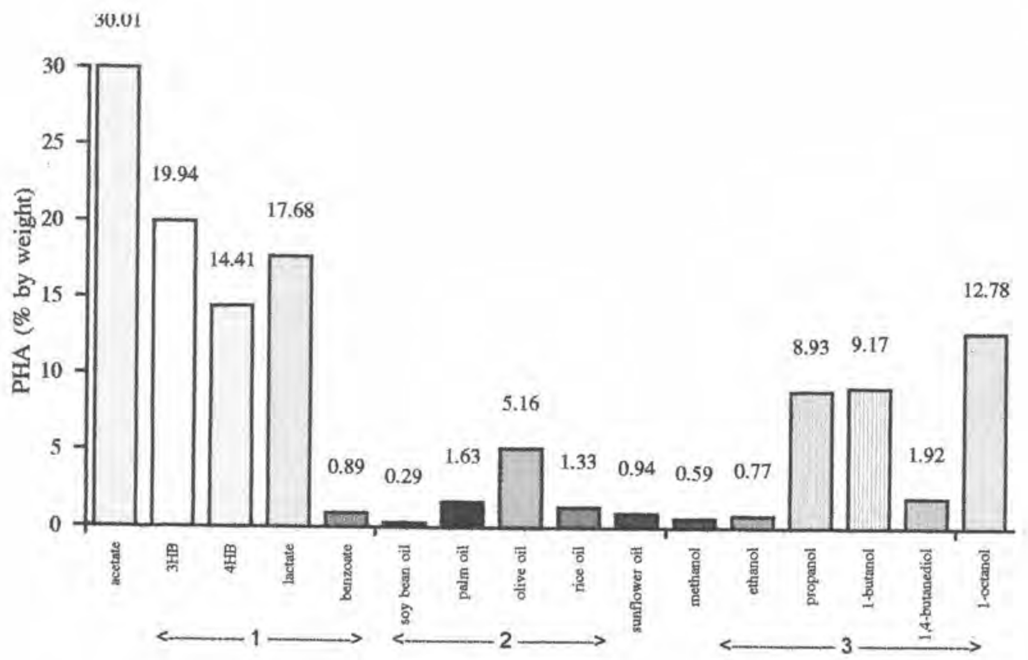
ตารางที่ 4(ง) ปริมาณพอลิเมอร์และสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิต ที่ใช้น้ำตาล 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว

น้ำตาล (10 กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHA (%/นน.)	โมโนเมอร์ (โมล %)			
			2HB	3HB	3HV	4HB
ไซโลส	3.58	21.58	0.2	99.5	0.2	0.1
กลูโคส	3.62	**22.62**	0	97.5	2.3	0.2
ฟรักโตส	2.62	20.73	0.1	98.1	1.2	0.6
กาแลกโตส	3.48	19.52	0	96.4	**3.5**	0.1
มอลโตส	3.63	20.28	0	98.6	1.3	0.1
แลกโตส	2.99	10.81	0	97.6	2.2	0.2
น้ำตาลทราย	**3.71**	**22.64**	0	98.6	1.4	0
แมนนิทอล	3.25	15.40	0	97.1	2.8	0.1

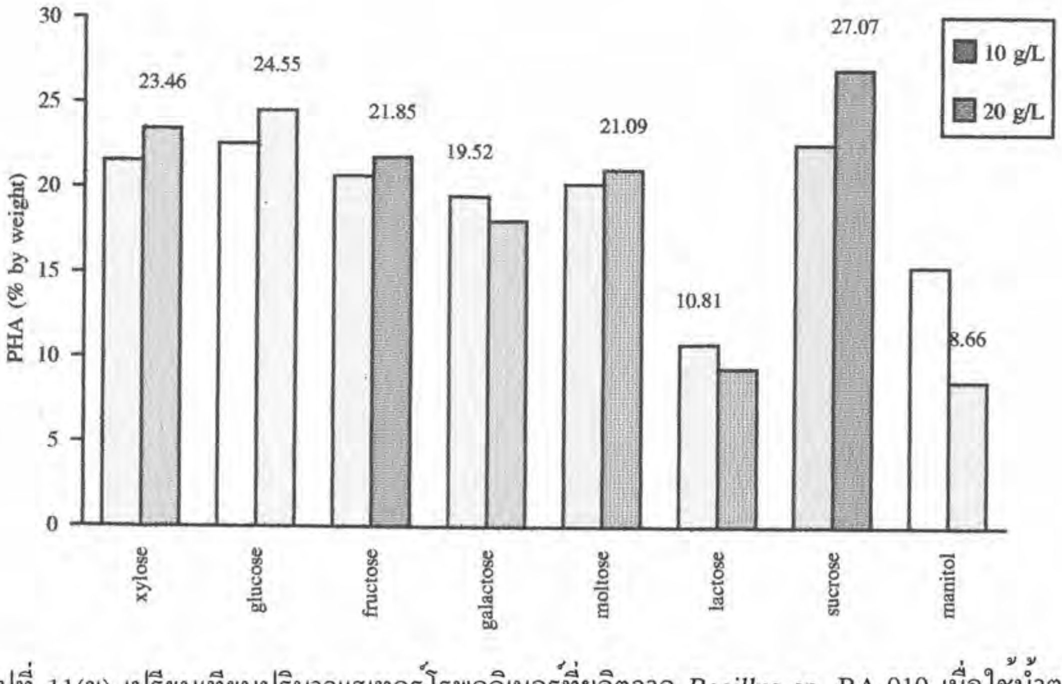
จากผลการทดลองจึงสรุปว่า มีความเป็นไปได้ในการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว เพื่อผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-*co*-3HV) แต่เนื่องจากสัดส่วนของ 3HV ที่ได้ยังต่ำ จึงศึกษาการเพิ่มน้ำตาลเป็น 20 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4(จ) พบว่า ได้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ พอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 3.82 กรัมต่อลิตร และ 27.07 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับเมื่อใช้น้ำตาลทราย แต่สัดส่วนของ 3HV ที่ได้ต่ำเพียง 1.8 โมลเปอร์เซ็นต์ สัดส่วนของโมโนเมอร์ของ 3HV เพิ่มขึ้นเป็น 6.1 และ 5.7 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้แลกโตสและมอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ แต่ปริมาณพอลิเมอร์ที่ได้ต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในน้ำตาลทราย ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่จำเป็นต้องเพิ่มสัดส่วนของ 3HV ให้สูงขึ้น

ตารางที่ 4(จ) ปริมาณพอลิเมอร์ ชนิดและสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิต ที่ใช้น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว

น้ำตาล (20 กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHA (%/นน.)	โมโนเมอร์ (โมล %)			
			2HB	3HB	3HV	4HB
ไซโลส	3.72	23.46	0.1	99.5	0.2	0.2
กลูโคส	3.71	24.55	0	96.5	3.2	0.3
ฟรักโตส	3.01	21.85	0	98.2	1.5	0.3
กาแลกโตส	3.66	18.08	0	97.5	2.4	0.1
มอลโตส	3.28	21.09	0	94.1	**5.7**	0.2
แลกโตส	2.62	9.39	0	93.6	**6.1**	0.3
น้ำตาลทราย	3.82	**27.07**	0	98.2	1.8	0
แมนนิทอล	3.62	8.66	0	97.8	2.0	0.2



รูปที่ 11(ก) เปรียบเทียบปริมาณเฮเทอร์โรพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้ (1) เกลือของกรดอินทรีย์ (2) น้ำมันพืช และ (3) แอลกอฮอล์เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว



รูปที่ 11(ข) เปรียบเทียบปริมาณเฮเทอร์โรพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้น้ำตาลปริมาณ 10 และ 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว

จากการศึกษาผลของซับสเตรตประเภทแหล่งคาร์บอน เพื่อผลิตเฮเทอร์โรพอลิเมอร์ พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิตเฮเทอร์โรพอลิเมอร์ได้จากแหล่งคาร์บอนเดี่ยวบางชนิด ได้แก่ กลุ่มของเกลือของกรดอินทรีย์ กรดไขมัน และกลุ่มของน้ำตาล โดยได้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV สูงจากการใช้โซเดียมแลกเตตและแลกโตส และ 4HB ในสัดส่วนที่สูงเมื่อใช้โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ส่วนกลุ่มน้ำมันพืชและแอลกอฮอล์จัดว่าไม่สามารถใช้เป็นซับสเตรตในการเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ได้ เนื่องจาก ปริมาณเฮเทอร์โรพอลิเมอร์และน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ต่ำมาก แม้จะได้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ที่สูงจากการใช้ น้ำมันมะกอก และ 1-ออกทานอล และได้สัดส่วนของ 4HB สูงเมื่อใช้ 1-บิวทานอล เมื่อพิจารณาปริมาณเฮเทอร์โรพอลิเมอร์ซึ่งสัดส่วนของโมโนเมอร์ซึ่งเป็น 3HB เป็นส่วนใหญ่ พบว่า ได้ปริมาณสูงเท่ากับ 30.01 และ 27.07 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อใช้โซเดียมอะซิเตต 10 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 11(ก) และ (ข)

3.4 ผลของซับสเตรตต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019

3.4.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทรายกับกรดกรดอินทรีย์และเกลือของกรดอินทรีย์บางชนิด

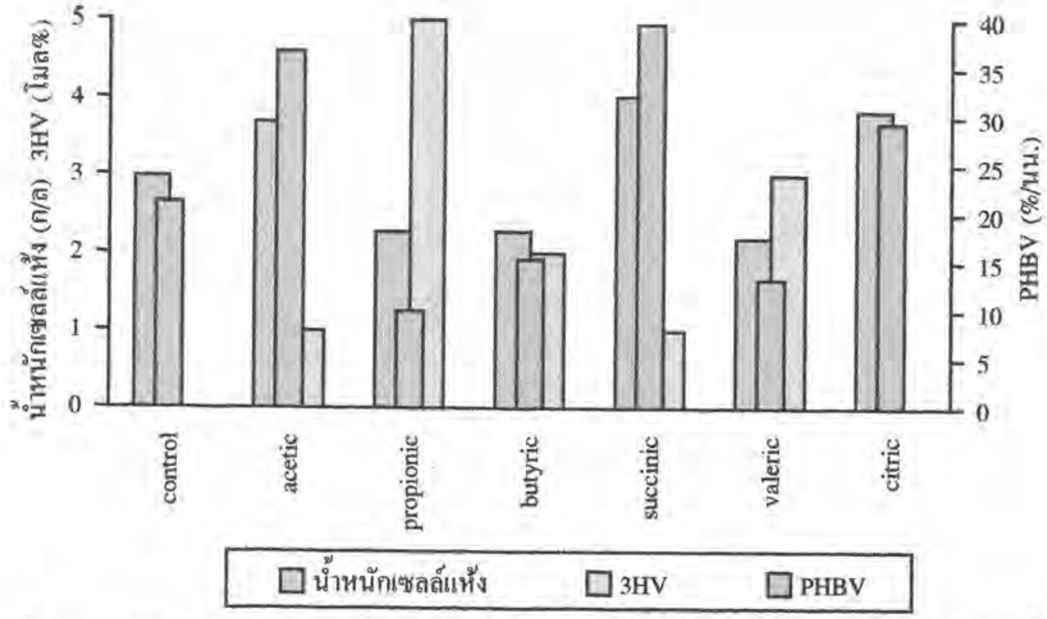
จากผลการศึกษาแหล่งคาร์บอนเดี่ยว พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 สามารถใช้แหล่งคาร์บอนเดี่ยวเพื่อผลิตเฮเทอร์โรพอลิเมอร์บางชนิด โดยได้โคพอลิเมอร์ P(3HB-*co*-3HV) หรือ PHBV เป็นส่วนใหญ่ และได้เทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-*co*-3HV-*co*-4HB) บ้าง ซึ่งส่วนใหญ่โมโนเมอร์ที่ได้คือ 3HB และได้โมโนเมอร์ชนิดอื่นในสัดส่วนที่ต่ำ เนื่องจากโคพอลิเมอร์ชนิด PHBV มีสมบัติที่ดีในการประยุกต์ใช้งานดังที่กล่าวไว้ในบทนำ ในการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV เพื่อนำไปประยุกต์ใช้งาน ควรผลิตได้โคพอลิเมอร์ PHBV ปริมาณสูงและมีสัดส่วนของ 3HV ในช่วงที่เหมาะสม (ไม่เกิน 30 โมลเปอร์เซ็นต์ Nobes และคณะ, 1994; Johansson, 1992) ซึ่งมีรายงานว่า การผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ประกอบด้วย 3HV ในสัดส่วนที่เหมาะสมนั้น เมื่อศึกษาจากวิถีการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV โดยจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่จำเป็นต้องมีสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์โมโนเมอร์ 3HV ซึ่งอาจเป็นกรดวาเลอริกหรือกรดโพรพิโอนิก (จากวิถีการสังเคราะห์ รูปที่ 6 และ 7) และจากรายงานวิจัยโดย Chen และคณะ (1991) พบว่า เมื่อเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารสำหรับการผลิตที่ประกอบด้วยกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดโพรพิโอนิก วาเลอริกและเฮปตะโนอิก 1.5 กรัมต่อลิตร พบว่า *Bacillus* ทุกสายพันธุ์ที่ศึกษาสามารถผลิต PHBV ได้ในอาหารที่เติมวาเลอริกและโพรพิโอนิก Park และคณะ (1997) เลี้ยงเชื้อ *Bacillus thuringiensis* R-510 โดยให้กลูโคส 30 กรัมต่อลิตรร่วมกับโพรพิโอเนต บิวทิเรต วาเลอเรต เฮกซะโนเอต เฮปตะโนเอต ออกตะโนเอต หรือโนนาโนเอต อย่างใดอย่างหนึ่ง ในรูปเกลือของโซเดียม ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร พบว่า เชื้อนี้สามารถผลิต PHBV ได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคสและโพรพิโอเนต เท่านั้น ส่วนในอาหารที่ประกอบด้วยเกลือเฮกซะโนเอต เฮปตะโนเอต ออกตะโนเอต โนนาโนเอต เชื้อไม่สามารถผลิต PHA ได้เลย จากการวิจัยของพิศิษฐ คงกำเนิด (2540) พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิต PHBV ที่มี 3HV ในสัดส่วนที่สูงจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดโพรพิโอนิกและกรดวาเลอริก และสามารถผลิต 3HV ได้เล็กน้อยจากใช้กรดอินทรีย์บางชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว ดังนั้นในงานวิจัยขั้นตอนนี้ จึงเลือกใช้กรดอินทรีย์บางชนิดร่วมกับน้ำตาลทรายเป็นอาหารสำหรับการผลิต เพื่อศึกษาหาชนิดของกรดอินทรีย์ชนิดที่ทำให้ *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีสัดส่วนของ 3HV สูงขึ้น

นำกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งเตรียมจากกล้าเชื้อตามผลการศึกษาที่ได้จากข้อ 3.2 ถ่ายลงในอาหารสำหรับการผลิตที่ใช้น้ำตาลทราย 19 กรัมต่อลิตร และกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ (1 กรัมต่อลิตร) คือ กรดอะซิติก โพรพิโอนิก บิวทิริก ซัคซินิก วาเลอริก และซิตริก เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 24 วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วนของโคพอลิเมอร์ PHBV ผลการวิจัย พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มี 3HV ในสัดส่วนที่สูงที่สุด เท่ากับ 5 โมลเปอร์เซ็นต์ในอาหารที่มีกรดโพรพิโอนิก รองลงมาคือ 3 โมลเปอร์เซ็นต์ในอาหารที่มีกรดวาเลอริก ส่วนปริมาณ PHBV และน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า ได้สูงสุดในอาหารมีกรดซัคซินิกและกรดอะซิติก ตามลำดับ ส่วนในชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่กรดและชุดการทดลองที่มีกรดซิตริก พบว่า ไม่สามารถผลิต 3HV ได้เลย ผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงเป็นโฮโมพอลิเมอร์ PHB ดังแสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 12

ตารางที่ 5 การผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดย *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับการผลิตที่ใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทรายและกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ

กรดอินทรีย์*	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHBV (%/นน.)	โมโนเมอร์ (โมล %)	
			3HB	3HV
ชุดควบคุม (ไม่เติมกรด)	2.98	21.21	100	0
กรดอะซิติก	3.69	**36.81**	99	1
กรดโพรพิโอนิก	2.27	10.00	**95**	**5**
กรดบิวทิริก	2.28	15.36	98	2
กรดซัคซินิก	**4.02**	**39.62**	99	1
กรดวาเลอริก	2.19	13.27	97	3
กรดซิตริก	3.83	29.40	100	0

* ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 6.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)



รูปที่ 12 เปรียบเทียบการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในน้ำตาลทรายกับกรดอินทรีย์บางชนิด

จากการทดลองที่ใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็น น้ำตาลทรายกับกรดโพรพิโอนิกหรือกรดวาเลอริกอย่างใดอย่างหนึ่งนั้น พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 ผลิต PHBV ที่มี 3HV ในสัดส่วนที่สูงกว่าเมื่อใช้กรดชนิดอื่น แต่ก็ยังอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำ จึงได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ที่ได้จากข้อ 3.2 ถ่ายลงในอาหารสำหรับการผลิตที่ใช้น้ำตาลทราย 18 17 16 15 และ 14 กรัมต่อลิตรกับกรดโพรพิโอนิก 2 3 4 5 และ 6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกรดวาเลอริก 2 3 4 5 และ 6 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5 เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 24 30 และ 36 นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วนของโคพอลิเมอร์ PHBV ผลการทดลองโดยแสดงค่าสูงสุดที่วิเคราะห์ได้ ดังแสดงตารางในที่ 6 พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มี 3HV ในสัดส่วนที่สูงขึ้น เมื่อมีโพรพิโอนิกและวาเลอริกเพิ่มขึ้น ผลการทดลอง แสดงว่า *Bacillus* sp. BA-019 ผลิต PHBV ที่มีสัดส่วนของ 3HV สูงที่สุดเท่ากับ 7 โมลเปอร์เซ็นต์ในชั่วโมงที่ 36 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลทราย 14 กรัมต่อลิตรผสมกับ กรดโพรพิโอนิก 6 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณ PHBV สูงที่สุดเท่ากับ 12.42 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้น้ำตาลทราย 16 กรัมต่อลิตร และกรดโพรพิโอนิก 4 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกมากกว่า 4 กรัมต่อลิตรปริมาณ PHBV และน้ำหนักเซลล์แห้งมีแนวโน้มลดลง

ตารางที่ 6 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วนของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทรายกับกรดโพรพิโอนิก

น้ำตาลทราย (กรัมต่อลิตร)	กรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHBV (%/นน.)	โมโนเมอร์ (โมล %)	
				3HB	3HV
18	2	3.82	11..72	98	2
17	3	3.84	10.24	97	3
16	4	3.84	**12.42**	95	5
15	5	3.69	9.42	94	6
14	6	3.32	9.67	93	**7**

ตารางที่ 7 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วนของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทรายกับกรดวาเลอริก

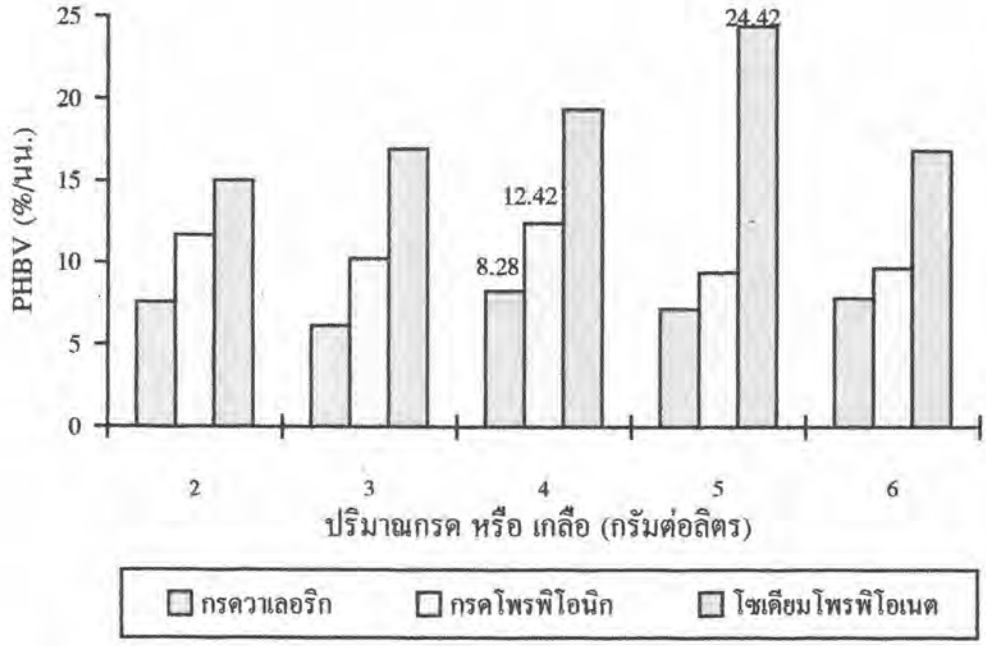
น้ำตาลทราย (กรัมต่อลิตร)	กรดวาเลอริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHBV (%/นน.)	โมโนเมอร์ (โมล %)	
				3HB	3HV
18	2	3.60	7.95	96	4
17	3	3.39	7.74	96	4
16	4	3.31	**8.28**	95	5
15	5	3.22	7.63	93	**7**
14	6	3.53	7.85	93	**7**

ผลการทดลอง จากตารางที่ 7 พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มี 3HV สูงที่สุดเท่ากับ 7 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้น้ำตาลทรายร่วมกับกรดวาเลอริก 5 และ 6 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ต่ำกว่าเมื่อใช้กรดวาเลอริกเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร โดยมีแนวโน้มว่าเมื่อมีกรดมากขึ้นปริมาณ PHBV ลดลงเช่นเดียวกัน จากผลการทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่า เมื่อมีกรดโพรพิโอนิกหรือวาเลอริกปริมาณเพิ่มขึ้น พบว่าเชื้อสามารถผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีสัดส่วนของ 3HV สูงขึ้น แต่ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ต่ำ และปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกรดโพรพิโอนิกสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกรดวาเลอริก นอกจากนั้นการใช้กรดดังกล่าวเป็นซับสเตรตได้พบว่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าต่ำมาก จึงจำเป็นต้องปรับ pH โดยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณมาก ขั้นตอนต่อไป จึงได้ศึกษาการใช้เกลือโซเดียมโพรพิโอเนตเปรียบเทียบกับการใช้กรดโพรพิโอนิกผสมกับน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 8 พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิต PHBV ที่มีปริมาณสูงขึ้นได้โดยมีสัดส่วน 3HV ที่สูงขึ้นด้วย เมื่อใช้เกลือโซเดียมโพรพิโอเนตแทนกรดโพรพินิก และพบว่าเมื่อมีปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนตเพิ่มขึ้นเป็น 5 และ 6 กรัมต่อลิตรโดยได้ 3HV เท่ากับ 8 โมลเปอร์เซ็นต์ในชั่วโมงที่ 36 ปริมาณของโคพอลิเมอร์ที่ได้สูงสุดเท่ากับ 24.42 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 24 เมื่อมีน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตรและโพรพิโอเนต 5 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการผลิต PHBV ในการใช้กรดโพรพิโอนิก กรดวาเลอริก และโซเดียมโพรพิโอเนตในชั่วโมงที่ 24 ซึ่งเป็นเวลาที่มีการผลิตสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 13 พบว่าการใช้โพรพิโอเนตในรูปของเกลือโซเดียม ทำให้ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงกว่าการใช้กรดโพรพิโอนิกและกรดวาเลอริก ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมโพรพิโอเนต 5 กรัมต่อลิตรทำให้ได้สัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์สูงที่สุด จากผลการทดลองนี้ จึงใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตรและโซเดียมโพรพิโอเนต 5 กรัมต่อลิตร สำหรับงานวิจัยขั้นต่อไป

ตารางที่ 8 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วนของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทรายกับโซเดียมโพรพิโอเนต

น้ำตาลทราย (กรัมต่อลิตร)	เกลือโพรพิโอเนต (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHBV (%/นน.)	โมโนเมอร์ (โมล %)	
				3HB	3HV
18	2	4.22	18.30	96	4
17	3	4.20	16.93	95	5
16	4	4.53	19.35	94	6
15	5	4.39	**24.42**	92	8
14	6	4.31	16.85	92	8



รูปที่ 13 เปรียบเทียบปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในน้ำตาลทรายกับกรดโพรพิโอนิก กรดวาเลอริกและเกลือโพรพิโอเนต

3.4.2 การศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV โดย *Bacillus* sp. BA-019

ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้สำหรับการผลิต PHBV ส่วนใหญ่ คือ แอมโมเนียมซัลเฟต เช่น การศึกษาของ Shimizu และคณะ (1999b) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* และ Son และ Lee (1996) ที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตรเป็นซับสเตรตสำหรับเชื้อ *Pseudomonas* sp. EL-2 เป็นต้น การศึกษาของ Park และคณะ (1997) ใน *Bacillus thuringiensis* R-510 ซึ่งใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ 4 กรัมต่อลิตร เป็นซับสเตรต Kim, G. J. และคณะ (1992) ศึกษาการผลิตโดย *Alcaligenes* sp. SH-69 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ และใช้แอมโมเนียมซัลเฟต สารสกัดยีสต์หรือยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าปริมาณและสัดส่วนของ PHBV ขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ โดยได้ปริมาณ PHBV สูงที่สุดถึง 58.7 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในแมนนิทอล 0.11 โมลาร์กับสารสกัดยีสต์ 2 กรัมต่อลิตร ส่วน Bitar และ Underhill (1990) ศึกษาการผลิต PHB จากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* H16 โดยใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า สามารถผลิต PHB เท่ากับ 63 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วน Chung และคณะ (1997) ใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ปริมาณ 0.083 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยง *A. eutrophus* NCIMB 11599 รัตนศิริ มุทิตากุล (2538) ได้ศึกษาการผลิต PHB ที่ใช้ชนิดของอินทรีย์ไนโตรเจนต่างๆ เปรียบเทียบกับแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนผลิต PHB ได้สูงที่สุด (แต่ทั้งนี้ไม่ได้ศึกษายูเรีย) ในงานวิจัยขั้นตอนนี้ ศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารสำหรับการผลิต PHBV จากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BA-019 โดยการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ สารสกัดจากยีสต์ และยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจน

ถ่ายกล้าเชื้อของ *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งเตรียมกล้าเชื้อตามผลการศึกษาที่ได้จากข้อ 3.2 ลงในอาหารสำหรับการผลิตที่ใช้ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ คือ น้ำตาลทรายปริมาณ 15 กรัมต่อลิตรและโซเดียมโพรพิโอเนต 5 กรัมต่อลิตร โดยไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ แปรผันชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ให้มีปริมาณของธาตุไนโตรเจนเท่ากัน โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เท่ากับ 0.1 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0.08 0.4 0.8 1.2 1.6 2.0 และ 2.4 สารสกัดจากยีสต์เท่ากับ 0.18 0.92 1.84 2.76 3.68 4.60 และ 5.53 และยูเรียเท่ากับ 0.05 0.23 0.45 0.68 0.91 1.14 และ 1.36 (ซึ่งทั้งนี้คิดเป็นปริมาณของธาตุไนโตรเจน เท่ากับ 2 8 15 23 30 38 และ 46 มิลลิโมลาร์ ตาม

ลำดับ) เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 30 และ 36 ชั่วโมง วัดค่า pH วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วนของโคพอลิเมอร์ PHBV ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์และยูเรียที่เหลือ

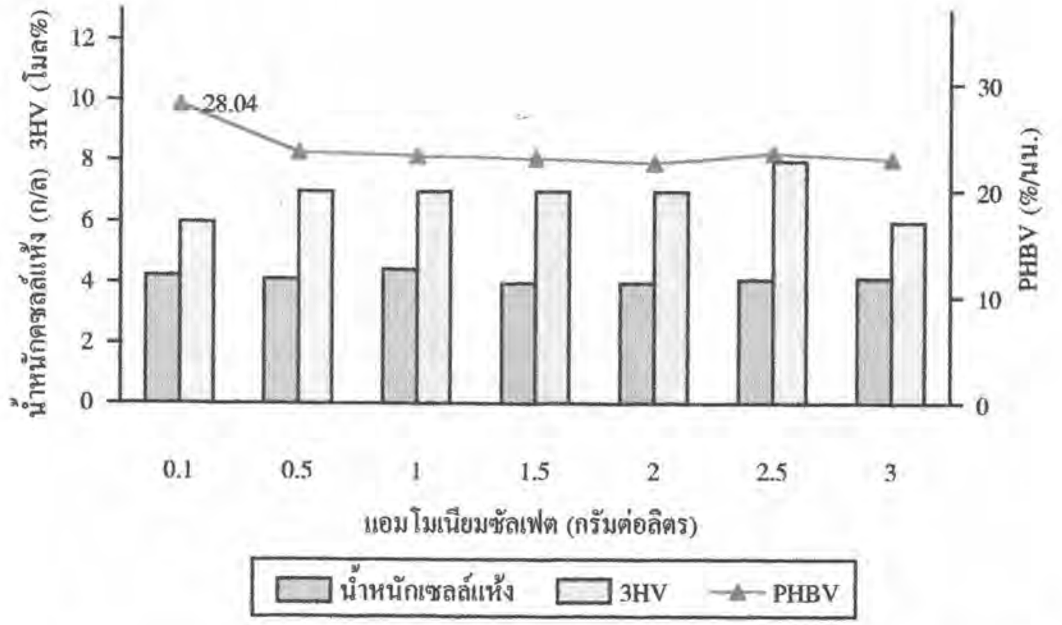
การศึกษาปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน จากผลการวิจัยที่แสดงค่าที่วิเคราะห์ได้สูงสุดดังตารางที่ 9 และรูปที่ 14 พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 6 ถึง 8 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าไม่แตกต่างกันนักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณต่างๆ ปริมาณ PHBV สูงสุดที่ได้เท่ากับ 28.04 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัมต่อลิตรที่เวลาชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ได้ใกล้เคียงกันคือประมาณ 4 กรัมต่อลิตร โดยไม่แตกต่างกันตามปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟต

จากผลการวิจัยตารางที่ 10 และรูปที่ 15 พบว่าการแปรผันปริมาณของแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0.08 0.4 0.8 1.2 1.6 2.0 และ 2.4 กรัมต่อลิตร *Bacillus* sp. BA-019 ผลิต PHBV ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ไม่แตกต่างกันโดยได้เท่ากับ 4 ถึง 6 โมลเปอร์เซ็นต์ ปริมาณ PHBV สูงที่สุดเท่ากับ 33.72 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อมีแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0.08 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ปริมาณแอมโมเนียมคลอไรด์มากกว่านี้ปริมาณ PHBV มีแนวโน้มลดลง น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 4 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 9 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วนของ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 0.1 ถึง 3.0 กรัมต่อลิตร

$(NH_4)_2SO_4$ (กรัมต่อลิตร)	pH สุดท้าย	นน.เซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHBV (%/นน.)	โมโนเมอร์(โมล%)		$(NH_4)_2SO_4$ ที่เหลือ (ก/ล)
				3HB	3HV	
0.1	4.62	4.22	**28.04**	94	6	0
0.5	4.54	4.12	23.56	93	7	0.04
1.0*	4.90	4.44	23.27	93	7	0.06
1.5	4.46	3.98	23.00	93	7	0.08
2.0	4.53	3.98	22.60	93	7	0.11
2.5	4.57	4.09	23.53	92	8	0.12
3.0	4.59	4.14	22.97	94	6	0.15

* คือ ชุดควบคุม

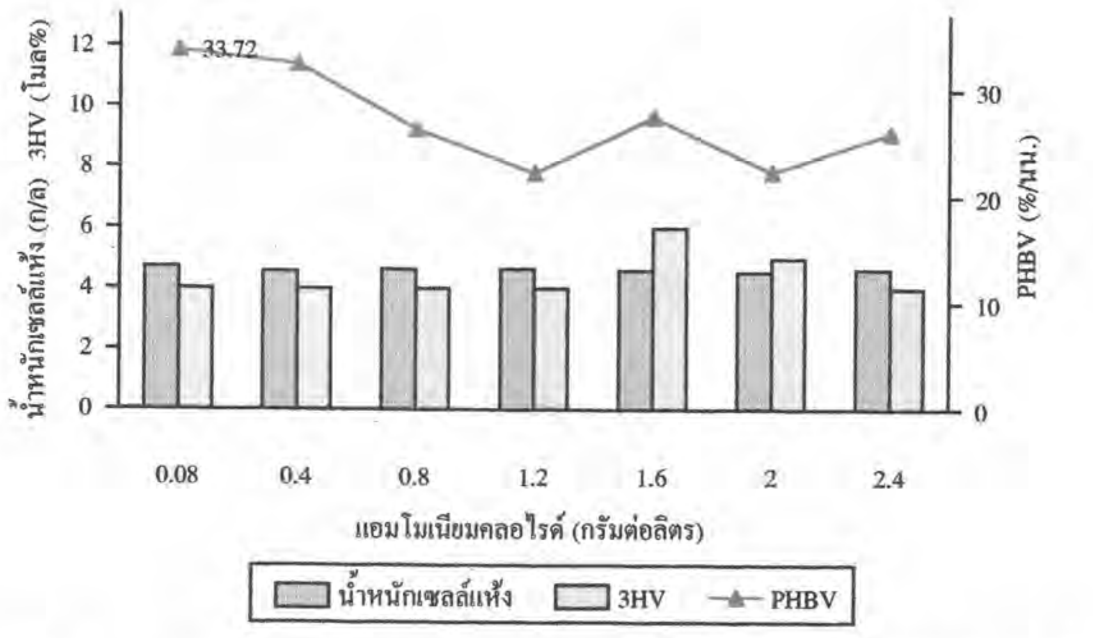


รูปที่ 14 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วน PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 ถึง 3 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 10 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วนของ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมคลอไรด์ปริมาณ 0.08 ถึง 2.4 กรัมต่อลิตร

NH_4Cl* (กรัมต่อลิตร)	pH สุดท้าย	นน.เซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHBV (%/นน.)	โมโนเมอร์(โมล%)		NH_4Cl ที่เหลือ (ก/ล)
				3HB	3HV	
0.08	4.89	4.71	**33.72**	96	4	0
0.4	4.71	4.56	32.44	96	4	0.03
0.8	4.63	4.64	26.36	96	4	0.05
1.2	4.63	4.65	22.23	96	4	0.07
1.6	4.64	4.60	27.48	94	6	0.08
2.0	4.60	4.55	22.31	95	5	0.11
2.4	4.66	4.63	26.03	96	4	0.14

* ปริมาณธาตุไนโตรเจน เท่ากับในแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 15 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วน PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0.08 ถึง 2.4 กรัมต่อลิตร

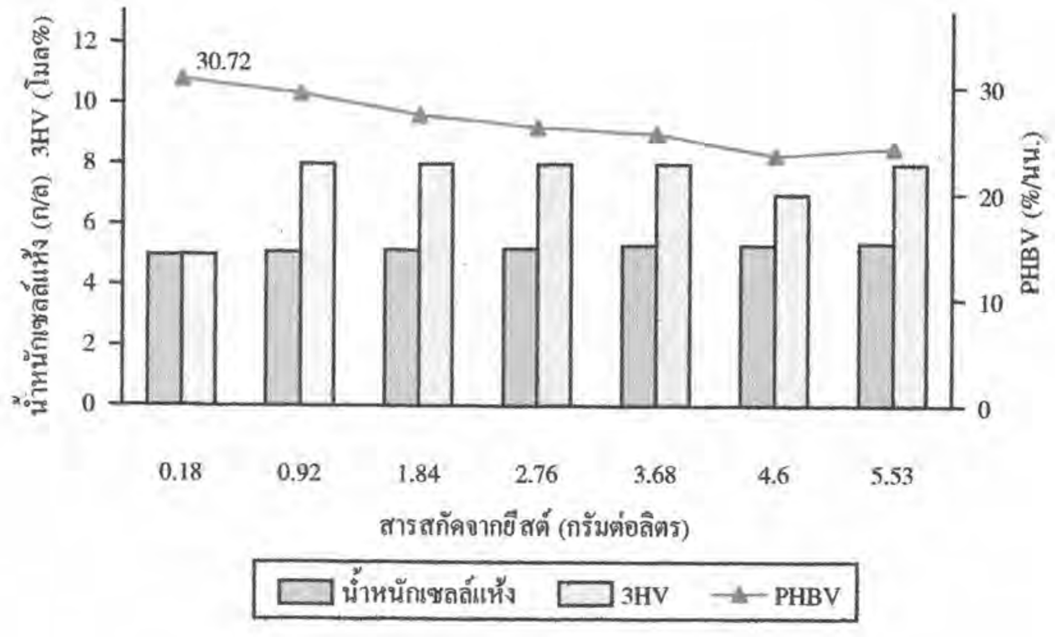
ผลของการศึกษาสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนซึ่งใช้ปริมาณเท่ากับ 0.18 0.92 1.84 2.76 3.68 4.60 และ 5.53 กรัมต่อลิตร จากผลการวิจัย (ตารางที่ 11 และรูปที่ 16) พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ตั้งแต่ 5 ถึง 8 โมลเปอร์เซ็นต์ ปริมาณ PHBV สูงสุดที่ได้เท่ากับ 30.72 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์ 0.18 กรัมต่อลิตร และเมื่อให้ปริมาณสารสกัดจากยีสต์มากกว่านี้ พบว่าปริมาณ PHBV ที่เชื้อผลิตได้มีแนวโน้มลดลง น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตามปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่มากขึ้น

การศึกษาการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณ เท่ากับ 0.05 0.23 0.45 0.68 0.91 1.14 และ 1.36 กรัมต่อลิตร จากผลการวิจัยดังแสดงในตารางที่ 12 และรูปที่ 17 พบว่าได้ สัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 5 ถึง 7 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าไม่แตกต่างกันนักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียูเรียในปริมาณต่างๆ เมื่อเพิ่มมีปริมาณยูเรียมากขึ้น พบว่า ปริมาณ PHBV เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆที่ศึกษา โดยพบว่า เมื่อใช้ยูเรียเท่ากับ 1.14 กรัมต่อลิตร *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ปริมาณสูงสุด เท่ากับ 37.83 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่ชั่วโมงที่ 30 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยได้สัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 5 โมลเปอร์เซ็นต์ ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยประมาณ 5 กรัมต่อลิตร และได้พบว่า เมื่อใช้ยูเรียเริ่มต้นต่ำกว่า 0.68 กรัมต่อลิตร ยูเรียถูกใช้หมดก่อนสิ้นสุดการทดลอง และค่า pH เพิ่มสูงขึ้นเมื่อปริมาณยูเรียเพิ่มขึ้น โดยค่า pH สุดท้ายสูงสุดเท่ากับ 7.16 เมื่อมียูเรีย เท่ากับ 1.36 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 11 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วนของ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 0.18 ถึง 5.53 กรัมต่อลิตร

สารสกัดจากยีสต์* (กรัมต่อลิตร)	pH สุดท้าย	นน.เซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHBV (%/นน.)	โมโนเมอร์(โมล%)	
				3HB	3HV
0.18	4.79	4.98	**30.72**	95	5
0.92	4.86	5.08	29.40	92	8
1.84	4.90	5.15	27.41	92	8
2.76	4.92	5.20	26.26	92	8
3.68	4.90	5.32	25.63	92	8
4.60	4.91	5.31	23.61	93	7
5.53	4.89	5.38	24.34	92	8

* ปริมาณธาตุไนโตรเจน เท่ากับในแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 กรัมต่อลิตร

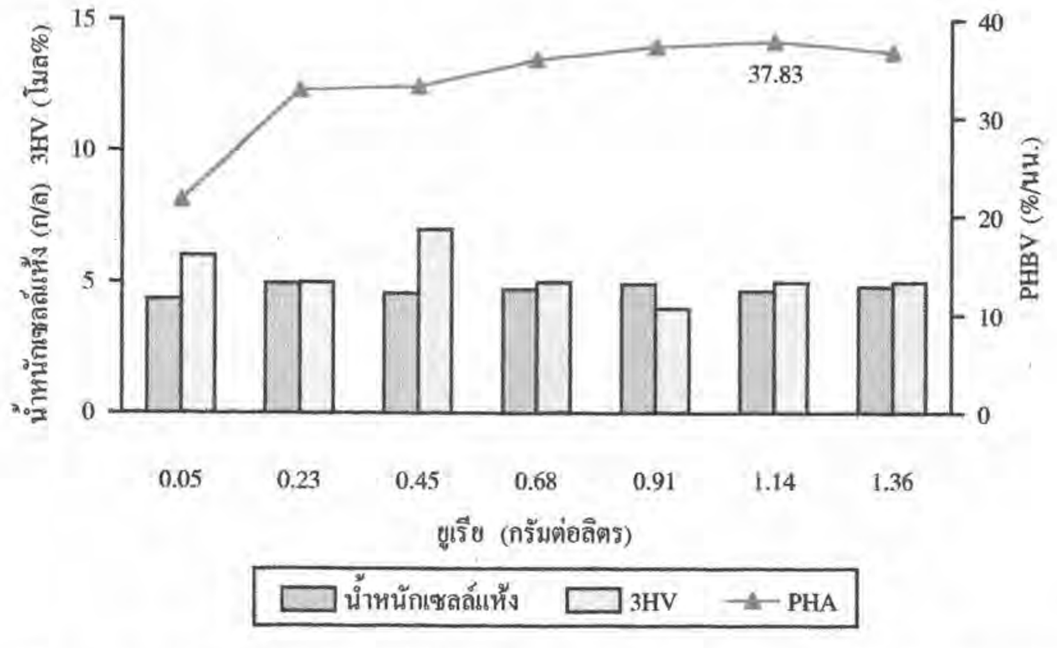


รูปที่ 16 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วน PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในสารสกัดจากยีสต์เท่ากับ 0.18 ถึง 5.53 กรัมต่อลิตร

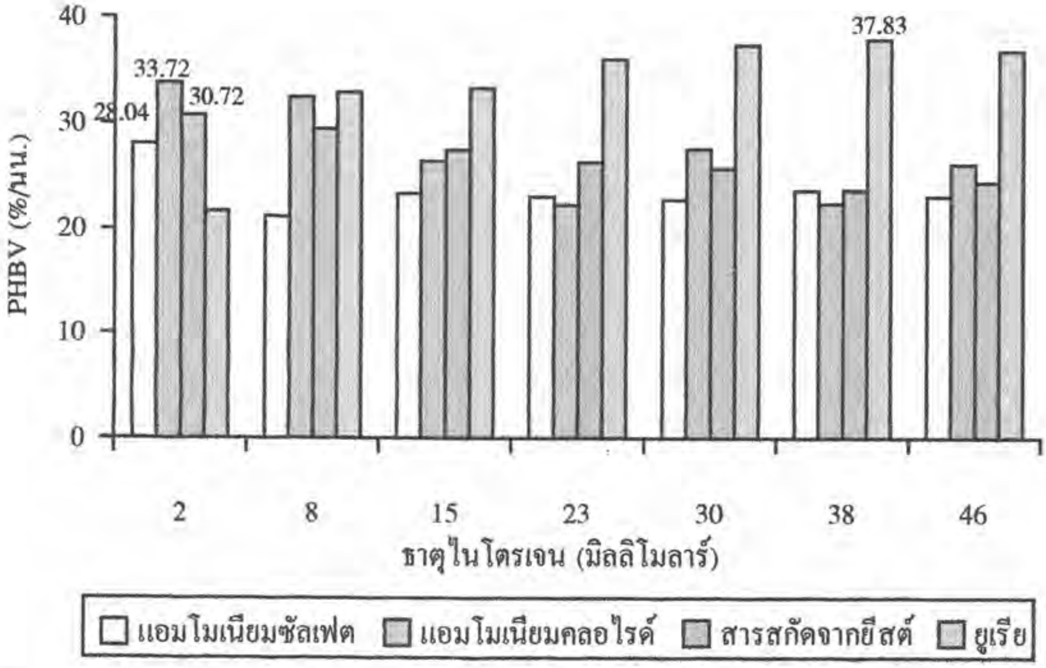
ตารางที่ 12 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วนของ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นยูเรียปริมาณ 0.05 ถึง 1.36 กรัมต่อลิตร

ยูเรีย* (กรัมต่อลิตร)	pH สุดท้าย	นน.เซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHBV (%/นน.)	โมโนเมอร์(โมล%)		ยูเรียที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
				3HB	3HV	
0.05	4.63	4.35	21.63	94	6	0
0.23	4.76	4.96	32.86	95	5	0
0.45	5.41	4.57	33.25	93	**7**	0
0.68	6.07	4.73	35.97	95	5	0.04
0.91	6.28	4.93	37.29	96	4	0.05
1.14	6.66	4.66	**37.83**	95	**5**	0.21
1.36	7.16	4.82	36.74	95	5	0.26

* ปริมาณธาตุไนโตรเจน เท่ากับในแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 17 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วน PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในยูเรียเท่ากับ 0.05 ถึง 1.36 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 18 เปรียบเทียบปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ในแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

จากผลการทดลองที่กล่าวมา สรุปได้ว่า เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับการผลิตที่ใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่มีปริมาณธาตุไนโตรเจนที่เท่ากัน (รูปที่ 18) พบว่า จากการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ และสารสกัดจากยีสต์ ปริมาณ 0.1 0.08 และ 0.18 กรัมต่อลิตร เป็นซับสเตรตที่มีปริมาณธาตุไนโตรเจนที่เท่ากัน คือเท่ากับ 2 มิลลิโมลาร์ ได้ปริมาณ PHBV สูงที่สุด และมีแนวโน้มลดลงเป็นลำดับเมื่อมีไนโตรเจนมากขึ้น สำหรับการใช้ยูเรีย พบว่า เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนทำให้เชื้อผลิต PHBV ได้ปริมาณสูงขึ้น และปริมาณยูเรียที่เพิ่มขึ้นมีผลให้ปริมาณ PHBV สูงขึ้น ซึ่งอาจมีผลจากค่า pH ที่อยู่ในช่วงประมาณสูงกว่า 6 ซึ่งอาจเหมาะสมสำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV แต่ทั้งนี้ไม่มีผลต่อการเพิ่มสัดส่วนของ 3HV ในโคพอลิเมอร์ เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองจึงใช้ยูเรียปริมาณเท่ากับ 1.14 กรัมต่อลิตรสำหรับงานวิจัยขั้นต่อไป

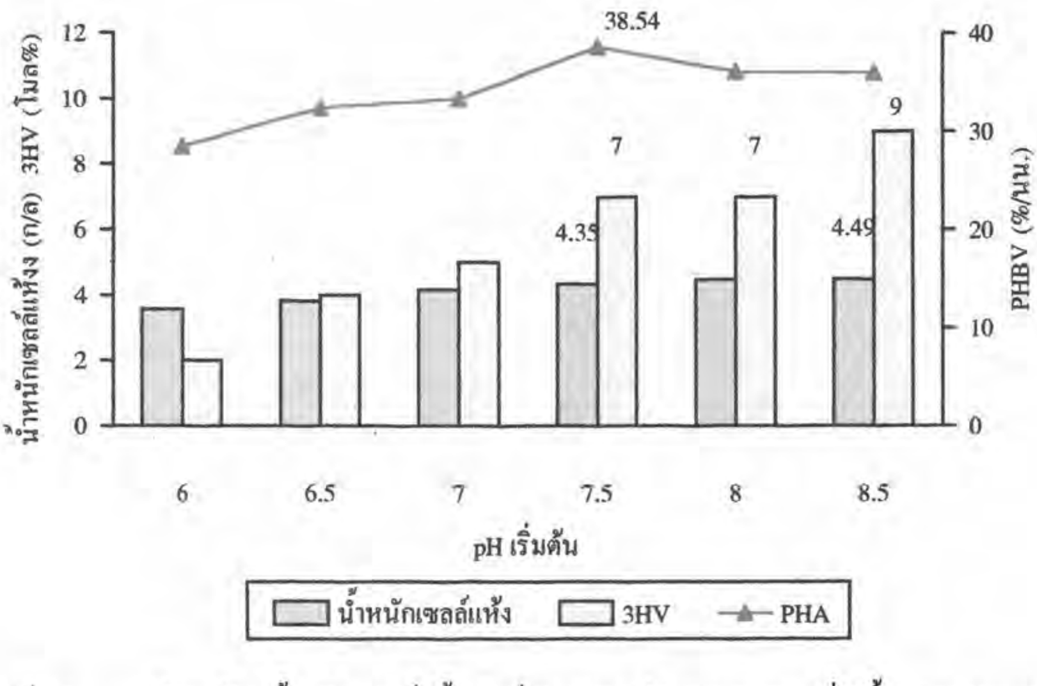
3.6 ภาวะในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ที่มีผลต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV

3.6.1 ผลของ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ พบว่า ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีผลให้ *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ได้มากขึ้น และเมื่อปริมาณของยูเรียเพิ่มขึ้นทำให้การสังเคราะห์ PHBV สูงขึ้นซึ่งแตกต่างจากแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น และจากการพิจารณาค่า pH พบว่า เมื่อปริมาณยูเรียเพิ่มขึ้นทำให้ค่า pH เพิ่มขึ้นตาม ซึ่ง pH อาจมีผลต่อการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV Chung และคณะ (1997) ทำการศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV จากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 โดยใช้ pH เริ่มต้น 6.5 7.0 และ 7.5 พบว่า เมื่อปรับ pH เริ่มต้นสูงขึ้นทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHBV สูงขึ้น เท่ากับ 3.0 กรัมต่อลิตรและ 28.9 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารที่เติมกรดโพรพิโอนิก 5 กรัมต่อลิตรร่วมกับกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ดังนั้น จึงศึกษา pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดยถ่ายกล้าเชื้อของ *Bacillus* sp. BA-019 ตามผลการวิจัยที่ได้จากข้อ 3.5 โดยแปรผัน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6 6.5 7 7.5 8 และ 8.5 เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 30 และ 36 ชั่วโมง นำมาวัดค่า pH วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้ ดังแสดงค่าที่วิเคราะห์ได้สูงสุดในตารางที่ 13 และรูปที่ 19 ผลการวิจัย พบว่า สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV สูงที่สุดเท่ากับ 9 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 8.5 รองลงมาคือ 7 โมลเปอร์เซ็นต์ที่ pH 8.0 และ 7.5 ตามลำดับ โดยสัดส่วนของ 3HV มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณ PHBV สูงสุดเพิ่มขึ้นเป็น 38.54 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.5 เมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 36 ชั่วโมง เมื่อ pH สูงขึ้นพบการผลิต PHBV มีปริมาณใกล้เคียงกัน น้ำหนักเซลล์แห้งมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อ pH สูงขึ้น โดยค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.49 กรัมต่อลิตร ค่า pH เท่ากับ 7.5 ถึง 8.5 เป็นค่าที่ พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 มีการเติบโตและผลิตโคพอลิเมอร์ได้ดีกว่าที่ค่า pH ต่ำกว่านี้ จากผลการทดลองนี้จึงเลือก pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.5 สำหรับงานวิจัยขั้นต่อไป

ตารางที่ 13 น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV และค่า pH เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 เพื่อการผลิต PHBV โดยแปรผันค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6 ถึง 8.5

pH เริ่มต้น	pH สุดท้าย	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PHBV (%/นน.)	โมโนเมอร์ (โมล %)	
				3HB	3HV
6.0	4.69	3.57	28.47	98	2
6.5	5.01	3.83	32.40	96	4
7.0	5.83	4.16	33.32	95	5
7.5	5.87	4.35	**38.54**	93	**7**
8.0	5.85	4.47	36.05	93	**7**
8.5	6.15	4.49	35.99	91	**9**



รูปที่ 19 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วน 3HV ปริมาณ PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ที่ pH ต่างๆ

เมื่อพิจารณาถึงผลการวิจัยเรื่องแหล่งไนโตรเจน ที่พบว่าการใช้ยูเรียมีความเหมาะสมนั้น อาจเนื่องมาจากค่า pH ซึ่งการเติมยูเรียมีผลให้ pH เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงเปรียบเทียบการใช้ยูเรียกับแอมโมเนียมซัลเฟตที่ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.5 โดยถ่ายกล้าเชื้อของ *Bacillus* sp. BA-019 ที่เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลงในอาหารสำหรับการผลิตที่ใช้น้ำตาลทรายปริมาณ 15 กรัมต่อลิตรและเกลือโพรพิโอเนต 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 1.0 และ 2.5 เปรียบเทียบกับยูเรีย 0.05 0.45 และ 1.14 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน (ซึ่งเป็นปริมาณที่มีธาตุไนโตรเจนเท่ากับ 2 15 และ 38 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ) โดยปรับ pH เริ่มต้นก่อนการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.5 เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 30 และ 36 ชั่วโมง นำมาวัดค่า pH วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้ ผลการศึกษาการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเปรียบเทียบกับยูเรีย โดยมีธาตุไนโตรเจนที่เท่ากัน และค่า pH เท่ากับ 7.5 พบว่า ไม่มีผลต่อสัดส่วนของ 3HV โดยได้ใกล้เคียงกับชุดควบคุม ส่วนการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 24.33 ถึง 28.86 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ได้ปริมาณ PHBV สูงสุดเท่ากับ 26.13 ถึง 32.98 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ 30 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ สรุปผลได้ว่า การใช้ยูเรียมีความเหมาะสมมากกว่าแอมโมเนียมซัลเฟตสำหรับเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิต โคพอลิเมอร์ PHBV โดย *Bacillus* sp. BA-019 จากผลงานวิจัยนี้จึงใช้ยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.5 สำหรับใช้ในงานวิจัยขั้นต่อไป

ตารางที่ 14 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ที่เปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนระหว่างแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย โดยปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 7.5

ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PHBV (%/นน.)	โมโนเมอร์ (โมล %)	
			3HB	3HV
แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1	3.60	25.83	95	5
แอมโมเนียมซัลเฟต 1.0	3.35	28.86	94	6
แอมโมเนียมซัลเฟต 2.5	3.21	24.33	96	4
ยูเรีย 0.05	3.71	26.13	92	8
ยูเรีย 0.45	3.86	31.86	93	7
ยูเรีย 1.14	4.25	32.98	93	7

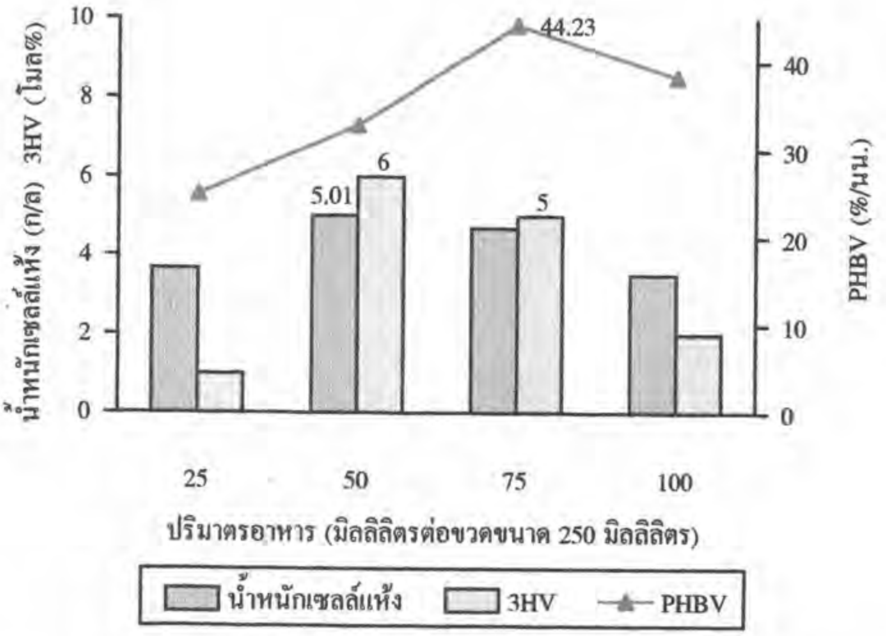
3.6.2 ผลของปริมาณอากาศในการเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019

Park และคณะ (1997) รายงานถึงผลของภาวะการให้อากาศต่อการเติบโตและการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดย *Bacillus thruringiensis* R-510 จากการเลี้ยงเชื้อในขวดทดลองขนาดเดียวกัน แต่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตรต่างกัน ซึ่งมีผลต่อปริมาณอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ปริมาตรอาหารเท่ากับ 25 50 75 100 125 และ 150 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที พบว่า เชื้อดังกล่าวสามารถผลิต PHBV ได้สูงที่สุดเท่ากับ 37 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในอาหารปริมาตร 75 มิลลิลิตร ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเมื่อใช้ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร Lee, I. Y. และคณะ (1995) ศึกษาภาวะการให้อากาศต่อการผลิต PHB โดยแปรผันปริมาตรอาหารเท่ากับ 50 100 150 200 และ 250 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที Savenkova และคณะ (1999) ก็ศึกษาการผลิต PHB โดยปริมาตรอาหารเท่ากับ 50 และ 100 มิลลิลิตรในขวดขนาด 750 มิลลิลิตรซึ่งเขย่าที่ 190 รอบต่อนาที การวิจัยขั้นนี้เป็นการศึกษาผลของปริมาณอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการแปรผันปริมาตรอาหารโดยคงที่ขนาดของขวดทดลองและรอบของการเขย่า ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งในการแปรผันปริมาตรของอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการศึกษาในระดับขวดเขย่า

ถ่ายกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ตามผลการวิจัยที่ได้จากข้อ 3.5 ปรับ pH เริ่มต้นก่อนการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.5 ศึกษาปริมาตรอาหารเท่ากับ 25 50 75 และ 100 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 30 และ 36 ชั่วโมง วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้ ผลสูงสุดที่ได้แสดงในตารางที่ 15 และรูปที่ 20 ผลการวิจัยได้พบว่า สัดส่วนของ 3HV สูงสุดเท่ากับ 6 และ 5 โมลเปอร์เซ็นต์ในปริมาตรอาหาร 50 และ 75 มิลลิลิตร ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกัน ปริมาณ PHBV สูงสุดเท่ากับ 44.23 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อใช้ปริมาตรอาหาร 75 มิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดเมื่อใช้ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตรเท่ากับ 5.01 กรัมต่อลิตร โดยพบว่าเมื่อให้อากาศปริมาณมาก (ปริมาตรอาหาร 25 มิลลิลิตร) ได้สัดส่วนของ 3HV น้อย (1 โมลเปอร์เซ็นต์) แต่ได้สัดส่วนของ 3HV สูงขึ้นในชุดการทดลองที่ให้อากาศปริมาตรน้อยลง (ปริมาตรอาหารเท่ากับ 50 และ 75 มิลลิลิตร) แต่เมื่อมีปริมาณอากาศน้อยเกินไป (ปริมาตรอาหารเท่ากับ 100 มิลลิลิตร) ได้พบว่าทั้งสัดส่วนของ 3HV และปริมาณ PHBV ที่ได้ลดต่ำลง ดังนั้น จากผลการทดลองนี้จึงเลือกปริมาตรอาหาร 75 มิลลิลิตรบรรจุในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที สำหรับใช้ในงานวิจัยขั้นต่อไป

ตารางที่ 15 น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อให้ปริมาณอากาศแตกต่างกัน โดยใช้ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตั้งแต่ 25 ถึง 100 มิลลิลิตร

ปริมาตรอาหาร (มิลลิลิตร)	เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHBV (%/นน.)	โมโนเมอร์ (โมล %)	
				3HB	3HV
25	30	3.66	25.06	99	1
50	30	**5.01**	32.88	94	6
75	30	4.69	**44.23**	95	5
100	30	3.51	38.33	98	2



รูปที่ 20 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วน 3HV ปริมาณ PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ที่ภาวะการให้อากาศปริมาณต่างๆ

3.7 ผลของคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีต่อการเพิ่มสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV

จากผลการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า มีผลของปัจจัยบางประการที่ทำให้ *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ได้ปริมาณสูงขึ้น แต่ทั้งนี้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ยังอยู่ในเกณฑ์ต่ำ ดังนั้นในงานวิจัยขั้นนี้ จึงศึกษาผลของปัจจัยที่คาดว่าน่าจะมีต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV

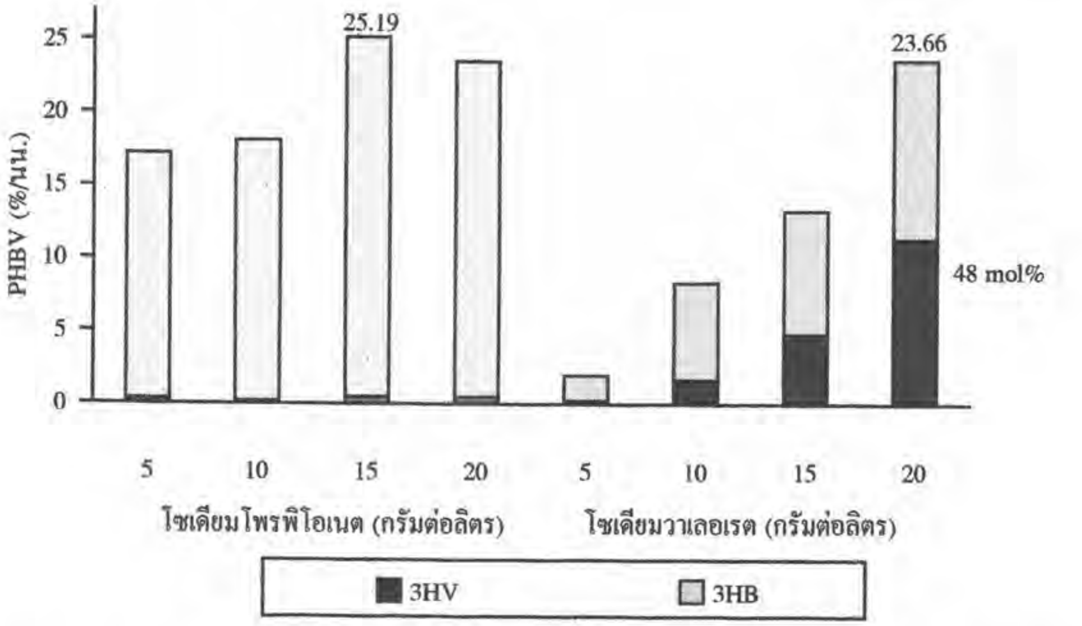
3.7.1 ผลการใช้โซเดียมโพรพิโอเนตหรือโซเดียมวาเลอเรตเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว

จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนในข้อ 3.4 ผลการศึกษาได้พบว่า เลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับการผลิตที่ประกอบด้วย แหล่งคาร์บอนผสมน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตรกับโซเดียมโพรพิโอเนต 5 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV เท่ากับ 24.42 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อปรับปรุงชนิดและปริมาณของซับสเตรตและภาวะการเลี้ยงเชื้อแล้วทำให้ได้ปริมาณ PHBV สูงขึ้นเป็น 44.23 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่ยังได้โมโนเมอร์ 3HV ในสัดส่วนที่ต่ำ (ไม่เกิน 8 โมลเปอร์เซ็นต์) ซึ่งอาจเนื่องมาจากชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่มีในอาหารสำหรับการผลิตยังไม่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์โมโนเมอร์ 3HV จึงได้ศึกษาปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนตหรือโซเดียมวาเลอเรตอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงชนิดเดียว

ถ่ายกล้าเชื้อของ *Bacillus* sp. BA-019 ที่เลี้ยงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อที่เพิ่มปริมาณเซลล์ อายุ 12 ชั่วโมง ลงในอาหารสำหรับการผลิต ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนตที่ศึกษาเท่ากับ 5 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตร หรือโซเดียมวาเลอเรตเท่ากับ 5 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว ยูเรีย 1.14 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับ pH เริ่มต้นก่อนการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.5 ใช้ปริมาตรอาหารเท่ากับ 75 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลานานเป็น 48 ชั่วโมง (เนื่องจากผลการทดลองที่ผ่านมา พบว่ามีแนวโน้มที่สัดส่วน 3HV เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเลี้ยงนานขึ้น) วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้จากการใช้โพรพิโอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว ดังผลการวิจัยตารางที่ 16(ก) พบว่า สัดส่วนของ 3HV สูงสุดประมาณ 2 โมลเปอร์เซ็นต์ โดยไม่แปรผันตามปริมาณโพรพิโอเนตที่เพิ่มขึ้น ปริมาณ PHBV ที่ได้สูงเท่ากับ 25.19 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้โพรพิโอเนต 15 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ใกล้เคียงกัน (2.89 ถึง 3.35 กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 16(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้โซเดียมโพรพิโอเนต หรือโซเดียมวาเลอเรต อย่างใดอย่างหนึ่ง ปริมาณ 5 ถึง 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

ชนิดของเกลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHBV (%/นน.)	โมโนเมอร์(โมล%)		เกลือที่เหลือ
			3HB	3HV	
โพรพิโอเนต 5	3.35	17.20	98	2	0.42
โพรพิโอเนต 10	3.06	18.09	99	1	1.68
โพรพิโอเนต 15	3.06	**25.19**	98	2	1.09
โพรพิโอเนต 20	2.89	23.55	98	2	2.15
วาเลอเรต 5	3.10	1.96	88	12	0.13
วาเลอเรต 10	3.39	8.37	80	20	0.70
วาเลอเรต 15	3.63	13.32	64	36	1.0
วาเลอเรต 20	3.83	**23.66**	52	**48**	1.2

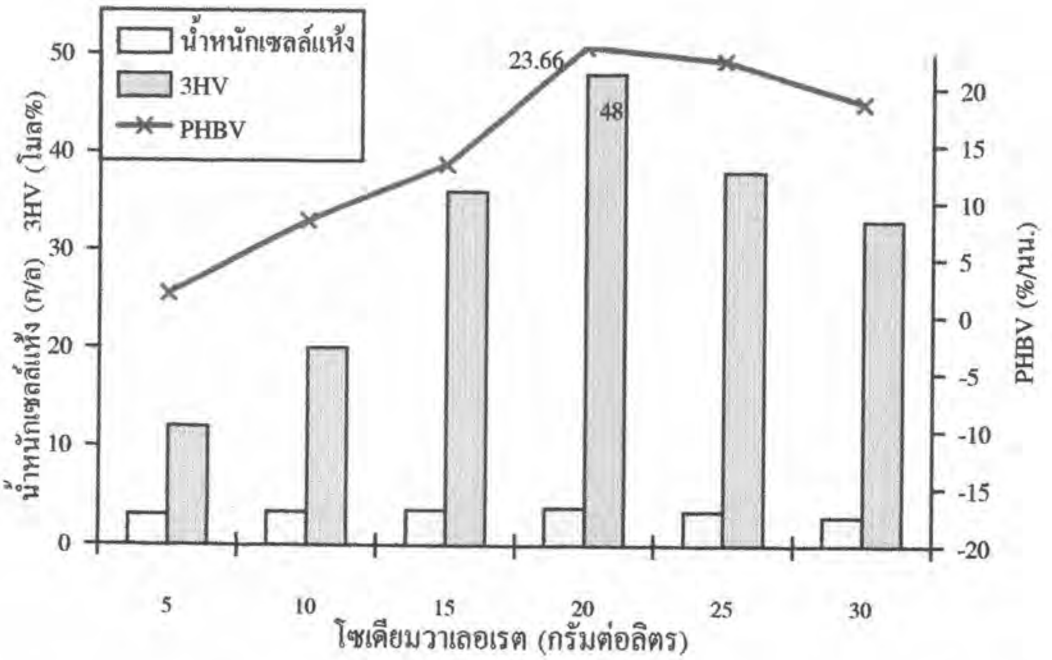


รูปที่ 21 เปรียบเทียบปริมาณปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV และสัดส่วน 3HV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในโซเดียมโพรพิโอเนตและโซเดียมวาเลอเรตปริมาณต่างๆ

จากการศึกษาการใช้โซเดียมวาเลอเรตเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยวปริมาณ 5 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตร ดังผลการวิจัยตารางที่ 16(ก) และ รูปที่ 17 พบว่าได้สัดส่วนของ 3HV ที่สูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจนตั้งแต่ 12 ถึง 48 โมลเปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 48 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ โดยโมโนเมอร์ของ 3HV สูงขึ้นตามปริมาณโซเดียมวาเลอเรตที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสูงสุดเมื่อใช้วาเลอเรตเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ได้สัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 48 โมลเปอร์เซ็นต์ และได้ปริมาณ PHBV เท่ากับ 23.66 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์แห้งได้เท่ากับ 3.10 ถึง 3.83 กรัมต่อลิตร ดังนั้น การใช้โซเดียมวาเลอเรตปริมาณ 20 กรัมต่อลิตรจึงเป็นซับสเตรตที่เหมาะสม ทั้งในด้านให้การเติบโต สัดส่วน 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ได้ทำการศึกษาปริมาณโซเดียม วาเลอเรตให้สูงขึ้นเป็น 25 และ 30 กรัมต่อลิตร ผลการวิจัยตารางที่ 16(ข) และ รูปที่ 22 พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณโซเดียมวาเลอเรตจาก 20 เป็น 25 และ 30 กรัมต่อลิตร โดยคาดว่าอาจจะมีผลให้เชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตโมโนเมอร์ 3HV ได้สัดส่วนสูงขึ้นอีก แต่สัดส่วนของ 3HV ที่ได้สูงสุดเมื่อมีโซเดียมวาเลอเรตเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร เท่ากับ 50 โมลเปอร์เซ็นต์ และสัดส่วน 3HV กลับลดลง เพื่อใช้โวเดียมวาเลอเรตปริมาณเพิ่มขึ้น ดังนั้น โซเดียมวาเลอเรตปริมาณ 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยวที่เหมาะสมเพื่อการผลิต PHBV ให้มีสัดส่วน 3HV สูง

ตารางที่ 16(ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วน 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้โซเดียมวาเลอเรต 20 ถึง 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

โซเดียมวาเลอเรต (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHBV (%/นน.)	โมโนเมอร์ (โมล%)	
			3HB	3HV
20	3.52	**25.68**	50	**50**
25	3.48	22.43	91	38
30	2.92	18.70	91	33

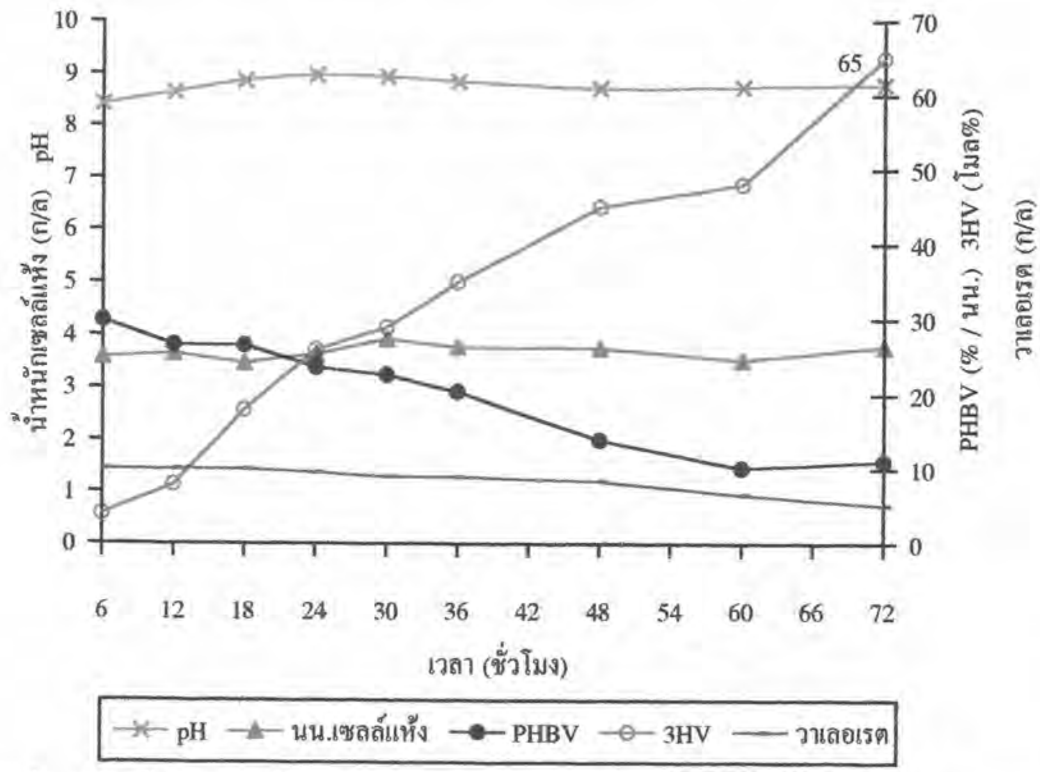


รูปที่ 22 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนของ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในโซเดียมวาเลอเรตปริมาณต่างๆ

จากผลการศึกษาพบว่า สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อนานขึ้น ดังนั้น จึงการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 นานขึ้นเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เพื่อนำมา วัดค่า pH วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้ และโซเดียมวาเลอเรตที่เหลือ ดังแสดงในตารางที่ 17 และรูปที่ 23 ผลการวิจัยได้พบว่า โมโนเมอร์ของ 3HV เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงจากเริ่มต้นถึงชั่วโมงที่ 72 และได้ 3HV เพิ่มสูงขึ้นอย่างมากโดยสัดส่วนสูงสุด เท่ากับ 65 โมลเปอร์เซ็นต์ น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV มีแนวโน้มลดลงเมื่อเลี้ยงเชื้อนานขึ้น ค่า pH สุดท้ายเพิ่มสูงขึ้นใกล้เคียงกัน โซเดียมวาเลอเรตลดลงเหลือ 5.1 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 17 น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่า pH สัดส่วนของ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBVที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ที่มีเกลือวาเลอเรต 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยวเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHBV (%/นน.)	โมโนเมอร์ (โมล%)		เกลือที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
				3HB	3HV	
6	8.41	3.58	29.92	96	4	10
12	8.64	3.64	26.66	92	8	10
18	8.86	3.46	26.58	82	18	10
24	8.96	3.63	23.64	74	26	9.6
30	8.93	3.91	22.60	71	29	9.0
36	8.85	3.77	20.44	65	35	9.0
48	8.71	3.74	13.99	55	45	8.4
60	8.73	3.51	10.17	52	48	6.6
72	8.78	3.77	11.06	35	65	5.1



รูปที่ 23 น้ำหนักเซลล์แห้ง pH สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBVที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับการผลิตที่มีโซเดียมวาลอเรต 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

3.7.2 ผลการใช้น้ำตาลทรายร่วมกับโซเดียมโพรพิโอเนตหรือโซเดียมวาเลอเรตเป็นแหล่งคาร์บอน

จากผลการทดลองโดยใช้โซเดียมวาเลอเรต 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว พบว่า ได้โมโนเมอร์ของ 3HV ในสัดส่วนที่สูง ซึ่งสามารถเลือกสัดส่วนที่ต้องการได้ตามระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ แต่พบว่าได้ปริมาณ PHBV ต่ำลงเมื่อเลี้ยงเชื้อนานขึ้น จึงต้องการศึกษาซับสเตรตที่เป็นแหล่งคาร์บอนผสมซึ่งทำให้ได้สัดส่วนของ 3HV ที่สูง และได้โคพอลิเมอร์ PHBV ในปริมาณที่สูงพอสมควรด้วย การศึกษาผลของโพรพิโอเนตต่อการสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV จาก *Alcaligenes eutrophus* ของ Lee I. Y. และคณะ ในปี 1994 พบว่า ที่ความเข้มข้นของของโพรพิโอเนตความเข้มข้นเดียวกัน สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV เพิ่มขึ้นจาก 15 ถึง 26 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อลดความเข้นข้นของกลูโคสเริ่มต้น ดังนั้นจึงศึกษาปริมาณน้ำตาลที่แตกต่างกันผสมกับโซเดียมโพรพิโอเนตหรือโซเดียมวาเลอเรต โดยถ่ายกล้าเชื้อของ *Bacillus* sp. BA-019 ลงในอาหารสำหรับการผลิตที่ใช้ปริมาณแหล่งคาร์บอนผสมระหว่าง โซเดียมโพรพิโอเนต 5 กรัมต่อลิตรกับน้ำตาลทราย 5 10 15 หรือ 20 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับ โซเดียมวาเลอเรต 5 กรัมต่อลิตรกับน้ำตาลทราย 5 10 15 หรือ 20 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้เนื่องจาก ผลการทดลองที่ผ่านมา น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำให้เชื้อมีการเติบโต และได้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงกว่าน้ำตาลอื่นๆ ใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นยูเรีย 1.14 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.5 ปริมาตรอาหาร 75 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 36 และ 48 ชั่วโมง วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้

ผลการวิจัยแสดงในตารางที่ 18(ก) พบว่า การเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยการใช้โซเดียมโพรพิโอเนต 5 กรัมต่อลิตรกับน้ำตาลทราย 5 ถึง 20 กรัมต่อลิตร ทำให้ได้สัดส่วนของ 3HV สูงขึ้นตั้งแต่ 15 ถึง 23 โมลเปอร์เซ็นต์ โดยได้สัดส่วน 3HV เท่ากับ 23 โมลเปอร์เซ็นต์เมื่อใช้น้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตรผสมกับโซเดียมโพรพิโอเนต 5 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณ PHBV เท่ากับ 29.43 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHBV สูงสุดเท่ากับ 32.18 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อใช้น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตรผสมกับโซเดียมโพรพิโอเนต 5 กรัมต่อลิตร และได้ 3HV เท่ากับ 20 โมลเปอร์เซ็นต์ น้ำหนักเซลล์แห้งอยู่ในช่วงใกล้เคียงกันประมาณ 4 ถึง 5 กรัมต่อลิตร ผลการใช้โซเดียมวาเลอเรต 5 กรัมต่อลิตรกับน้ำตาลทราย 5 ถึง 20 กรัมต่อลิตร พบว่า สัดส่วนของ 3HV เพิ่มสูงขึ้นใกล้เคียงกันเท่ากับ 22 ถึง 26 โมลเปอร์เซ็นต์ ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงสุดเท่ากับ 35.18 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อใช้น้ำตาลทราย 15 กรัม

ต่อลิตร เลี้ยงเชื้อนาน 48 ชั่วโมง ส่วนการเติบโตของ *Bacillus* sp. BA-019 พบว่า ได้น้ำหนักเซลล์แห้งใกล้เคียงกับ โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งน้อยที่สุดเมื่อน้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 18(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นโซเดียมโพรพิโอเนต 5 หรือโซเดียมวาเลอเรต 5 และน้ำตาลทราย 5 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตร

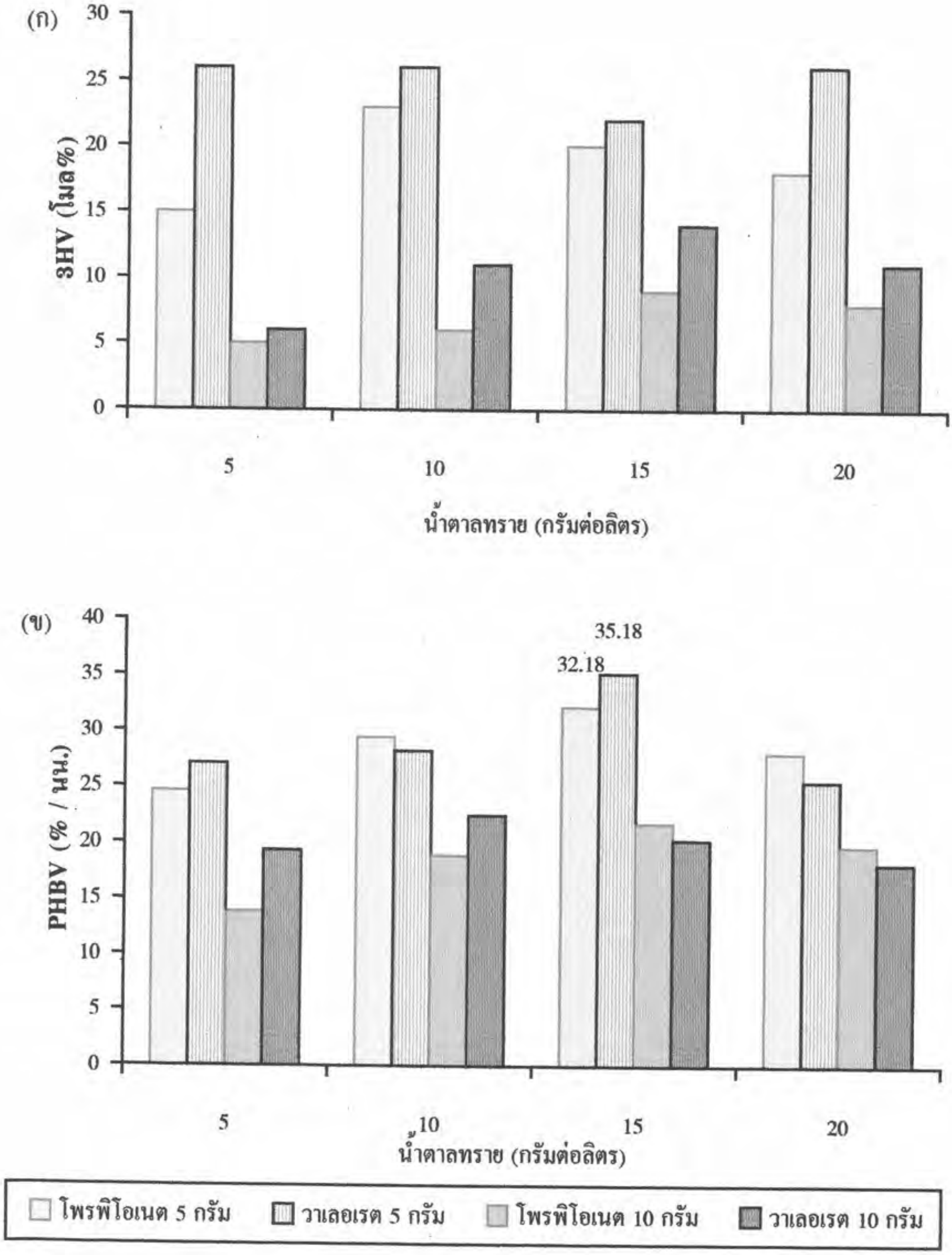
ชนิดของเกลือ (5 กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทราย (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHBV (%/นน.)	โมโนเมอร์ (โมล%)	
				3HB	3HV
โซเดียมโพรพิโอเนต	5	4.36	24.60	85	15
	10	5.39	29.43	77	**23**
	15	4.79	**32.18**	80	**20**
	20	4.46	28.05	82	18
โซเดียมวาเลอเรต	5	4.31	27.02	74	**26**
	10	5.19	28.23	74	**26**
	15	4.93	**35.18**	78	**22**
	20	3.85	25.56	72	**26**

จากผลการศึกษาดังที่กล่าวมา พบว่า การใช้ซับสเตรตเป็นโซเดียมโพรพิโอเนต หรือโซเดียมวาเลอเรตปริมาณ 5 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนผสมที่ทำให้ *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ได้ปริมาณสูงขึ้น และได้สัดส่วนของ 3HV ในสัดส่วนที่สูงพอสมควร (20 หรือมากกว่า 20 โมลเปอร์เซ็นต์) แต่ยังต้องการศึกษาการเพิ่มปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV และสัดส่วน 3HV ขึ้นอีก จึงทดลองใช้แหล่งคาร์บอนผสมที่มีโซเดียมโพรพิโอเนตหรือโซเดียมวาเลอเรตเพิ่มขึ้นจาก 5 กรัมต่อลิตรเป็น 10 กรัมต่อลิตร ผสมกับน้ำตาลทราย 10 15 หรือ 20 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 18(ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นโซเดียมโพรพิโอเนต 10 หรือโซเดียมวาเลอเรต 10 และน้ำตาลทราย 5 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตร

ชนิดของเกลือ (10 กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทราย (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHBV (%/นน.)	โมโนเมอร์ (โมล%)	
				3HB	3HV
โซเดียมโพรพิโอเนต	5	3.28	13.83	95	5
	10	3.69	18.92	94	6
	15	3.54	**21.76**	91	**9**
	20	3.73	19.76	92	8
โซเดียมวาเลอเรต	5	3.34	19.33	94	6
	10	3.96	**22.48**	89	11
	15	4.05	20.28	86	**14**
	20	3.78	18.17	79	11

จากผลการวิจัยดังแสดงในตารางที่ 18(ข) พบว่า การใช้โซเดียมโพรพิโอเนต 10 กรัมต่อลิตรกับน้ำตาลทราย 5 ถึง 20 กรัมต่อลิตร ไม่มีผลให้โมโนเมอร์ของ 3HV เพิ่มขึ้น แต่กลับได้เพียง 6 ถึง 14 โมลเปอร์เซ็นต์ โดยได้สัดส่วนสูงสุดเมื่อให้น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตรผสมกับโซเดียมโพรพิโอเนต 10 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณ PHBV สูงสุดเท่ากับ 21.76 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Bacillus* sp. BA-019 ใกล้เคียงกัน (3.28 ถึง 3.73 กรัมต่อลิตร) เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นโซเดียมวาเลอเรต 10 กรัมต่อลิตรกับน้ำตาลทราย 5 ถึง 20 กรัมต่อลิตร พบว่า สัดส่วนของ 3HV สูงสุดเท่ากับ 14 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้น้ำตาลทรายเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHBV ที่สูงที่สุดเท่ากับ 22.48 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยได้สัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 11 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้น้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Bacillus* sp. BA-019 ได้ใกล้เคียงกันประมาณ 3 ถึง 4 กรัมต่อลิตร

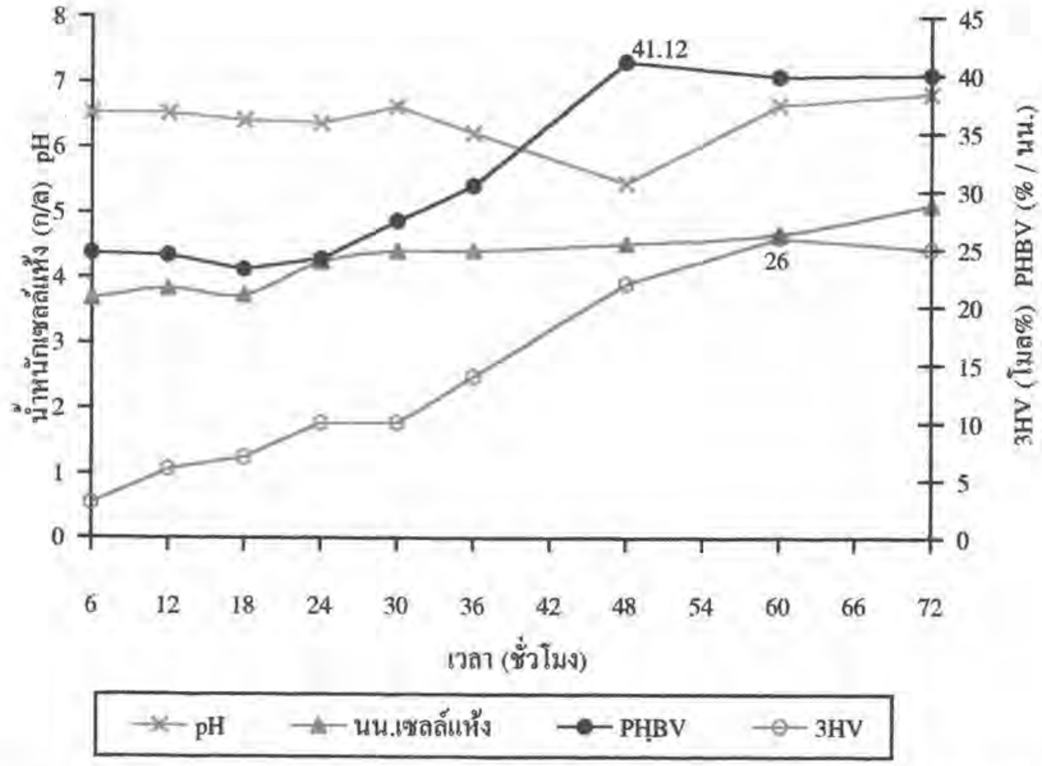


รูปที่ 24 (ก) สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และ (ข) ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับการผลิตที่ใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างโซเดียมโพรพิโอเนตหรือโซเดียมวาเลอเรตกับน้ำตาลทรายปริมาณต่างๆ

สรุปผลการวิจัยในรูปที่ 24 พบว่า เมื่อใช้คาร์บอนผสมเป็นโซเดียมโพรพิโอเนตหรือโซเดียมวาเลอเรต 10 กรัมต่อลิตรผสมกับน้ำตาลทราย สัดส่วนของ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ได้ต่ำกว่า การโซเดียมโพรพิโอเนตและโซเดียมวาเลอเรต 5 กรัมต่อลิตรผสมกับน้ำตาลทราย เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างการใช้โซเดียมโพรพิโอเนตและโซเดียมวาเลอเรต 5 กรัมต่อลิตร พบว่า การใช้โซเดียมวาเลอเรตทำให้ *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตได้โมโนเมอร์ 3HV ได้สูงกว่าการใช้โซเดียมโพรพิโอเนต แต่ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ใกล้เคียงกันซึ่งสูงสุดเมื่อให้น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร (35.18 และ 32.18 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ) จากผลงานวิจัยนี้จึงเลือกน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตรและโซเดียมวาเลอเรต 5 กรัมต่อลิตร สำหรับใช้ในงานวิจัยขั้นต่อไปและติดตามการเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ทุก 6 ชั่วโมงเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ตามวิธีการเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการศึกษา วัดค่า pH วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้ ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 19 และรูปที่ 25

ตารางที่ 19 น้ำหนักเซลล์แห้ง pH สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBVที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ที่มีน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตรและโซเดียมวาเลอเรต 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	ค่าพีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHBV (%/นน.)	โมโนเมอร์ (โมล%)	
				3HB	3HV
6	6.53	3.68	24.61	97	3
12	6.53	3.83	24.42	94	6
18	6.42	3.73	23.22	93	7
24	6.38	4.24	24.14	90	10
30	6.63	4.41	27.38	90	10
36	6.23	4.42	30.46	86	14
48	5.46	4.53	**41.12**	78	**22**
60	6.65	4.68	39.86	74	**26**
72	6.83	5.12	40.01	85	25



รูปที่ 25 น้ำหนักเซลล์แห้ง pH สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBVที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตรและโซเดียมวาเลอเรต 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

ผลการวิจัย (ตารางที่ 19) ได้พบว่า โมโนเมอร์ 3HV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ได้เท่ากับ 3 ถึง 26 โมลเปอร์เซ็นต์ โดยได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 60 และ 48 (26 และ 22 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นถึงประมาณ 5 กรัมต่อลิตร ตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ และได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 41.12 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยได้สัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 22 โมลเปอร์เซ็นต์ และพบว่า ค่า pH ของ น้ำหมัก มีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 6 ซึ่งต่ำกว่าเมื่อใช้โซเดียมวาเลอเรตโดยไม่มีน้ำตาลทรายเป็นซับสเตรตร่วม

3.7.3 อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน

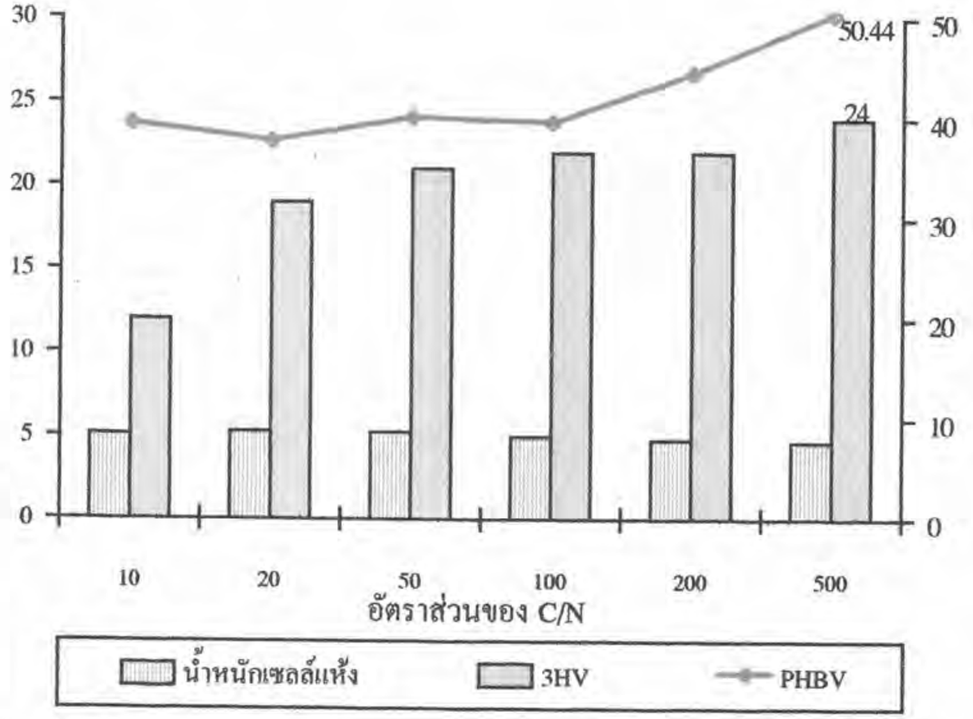
จากการศึกษาของ Rhee และคณะ (1993) ศึกษาการผลิต PHBV โดย *Alcaligenes* sp. SH-69 ที่ใช้เพียงกลูโคสและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นซับสเตรต โดยศึกษาผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน พบว่า อัตราส่วนของ C/N (โมลต่อโมล) ที่สูงขึ้นทำให้ได้ปริมาณ PHBV สูงขึ้น อัตราส่วน C/N ที่ต่ำมีผลทำให้สัดส่วนของ 3HV สูง (ตามเวลาการเลี้ยงที่นานขึ้น) โดยสัดส่วนของ 3HV ที่สูงสุด เท่ากับ 6.3 โมลเปอร์เซ็นต์เมื่อสิ้นสุดการทดลอง Shimizu และคณะ (1999b) ศึกษาอัตราส่วนของ C/N ในการเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* พบว่า เมื่อ C/N ต่ำ เชื้อมีการเติบโตสูง แต่ปริมาณการผลิต PHBV ต่ำ การวิจัยขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีผลต่อสัดส่วนของ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV โดยถ่ายกล้าเชื้อของ *Bacillus* sp. BA-019 ลงในอาหารสำหรับการผลิตโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมตามผลการวิจัยข้อ 3.7.2 แปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนในรูปของน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตรและโซเดียมวาเลอเรต 5 กรัมต่อลิตร ต่อไนโตรเจนในรูปของยูเรียปริมาณต่างๆ ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วน C/N หน่วยเป็นโมลต่อโมล เท่ากับ 10 20 50 100 200 และ 500 ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.5 ปริมาตรอาหาร 75 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 36 และ 48 ชั่วโมง วัดค่า pH วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้

ผลการวิจัยในตารางที่ 20 และรูปที่ 26 พบว่า การศึกษาอัตราส่วน C/N เท่ากับ 10 ถึง 500 โมลต่อโมล สัดส่วนของ 3HV ที่ได้เท่ากับ 12 ถึง 24 โมลเปอร์เซ็นต์ โดยสูงขึ้นตามอัตราส่วน C/N ที่เพิ่มขึ้นและสูงสุดที่อัตราส่วนเท่ากับ 500 ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตได้สูงสุดเพิ่มขึ้นเป็น 50.44 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยมีสัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 24 โมลเปอร์เซ็นต์ น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (5.25 กรัมต่อลิตร) ที่ C/N เท่ากับ 20 และมีแนวโน้มลดลงตามอัตราส่วน C/N ที่สูงขึ้น ค่า pH สุดท้ายไม่ต่างกันมากนัก จากงานวิจัยนี้จึงเลือกอัตราส่วน C/N เท่ากับ 500 โมลต่อโมล เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับใช้ในงานวิจัยขั้นต่อไป

ตารางที่ 20 น้ำหนักเซลล์แห้ง pH สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคาร์บอนต่อไนโตรเจน ตั้งแต่ 10 ถึง 500 โมลต่อโมล

คาร์บอน ต่อ ไนโตรเจน	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHBV (%/นน.)	โมโนเมอร์ (โมล%)	
				3HB	3HV
10	5.85	5.08	39.51	88	12
20*	5.61	**5.25**	37.79	81	19
50	5.92	5.20	40.19	79	21
100	5.18	4.95	39.69	78	22
200	5.93	4.75	44.55	78	22
500	5.39	4.64	**50.44**	76	**24**

* คือ ชุดควบคุม



รูปที่ 26 เปรียบเทียบสัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างกัน

3.8 ผลของแร่ธาตุที่สำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV

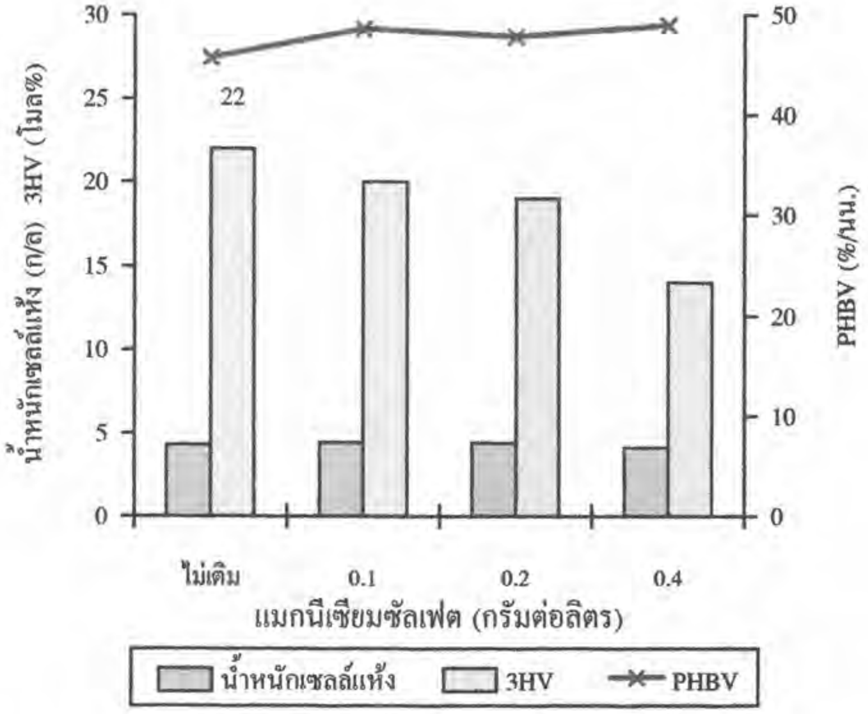
Steinbuchel และ Schelegel สรุปไว้ในปี 1989 (อ้างถึงใน Braunegg และคณะ, 1998) ว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับการผลิต PHA ที่มีปริมาณของแหล่งคาร์บอนมากเกินพอและมีการจำกัดปริมาณสารอาหารบางอย่าง ได้แก่ ออกซิเจน ไนโตรเจน ซัลเฟต แมกนีเซียม ฟอสเฟต โพแทสเซียม และเหล็ก พบว่า มีผลต่อการผลิต PHA โดยได้ปริมาณที่สูงขึ้น Rhee และคณะ (1993) และ Shimizu และคณะ (1999b) กล่าวถึงผลที่มีต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV มีเฉพาะการจำกัดปริมาณไนโตรเจนและออกซิเจน Park และคณะ (1997) พบว่า เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus thuringiensis* R-510 ที่ไม่เติมแอมโมเนียม ฟอสเฟต ซัลเฟต โพแตสเซียม แมกนีเซียม และเหล็ก ไม่มีผลให้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงขึ้น ในการวิจัยขั้นนี้เป็นการศึกษาผลของแร่ธาตุบางชนิดที่เป็นองค์ประกอบหลักอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิต ที่มีต่อสัดส่วนและปริมาณของ PHBV

3.8.1 ผลของแมกนีเซียมซัลเฟต

ถ่ายกล้าเชื้อของ *Bacillus* sp. BA-019 ลงในอาหารสำหรับการผลิตตามภาวะที่เหมาะสมตามการวิจัยข้อ 3.7 โดยใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0 0.1 0.2 และ 0.4 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 36 และ 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนของโมโนเมอร์ และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้ ข้อมูลค่าสูงสุดที่วิเคราะห์ได้แสดงในตารางที่ 21 และรูปที่ 27 ผลการวิจัย พบว่า สัดส่วนของ 3HV ที่ได้เท่ากับ 14 ถึง 22 โมลเปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อใช้แมกนีเซียมซัลเฟตในปริมาณสูงขึ้นมีแนวโน้มทำให้โมโนเมอร์ของ 3HV ที่ได้ต่ำลง ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV และน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อใกล้เคียงกันประมาณ 47 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ 4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนในการทดลองที่ไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตเลย พบว่า ได้ปริมาณ PHBV ต่ำที่สุด จึงใช้แมกนีเซียมซัลเฟต เท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณเดิมที่ใช้สำหรับใช้ในงานวิจัยขั้นต่อไป

ตารางที่ 21 น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBVที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ที่แมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณ 0 ถึง 0.4

แมกนีเซียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHBV (% / นน.)	โมโนเมอร์ (โมล%)	
			3HB	3HV
0	4.31	45.72	78	**22**
0.1	4.43	48.65	80	20
0.2	4.39	47.82	81	19
0.4	4.09	48.95	86	14



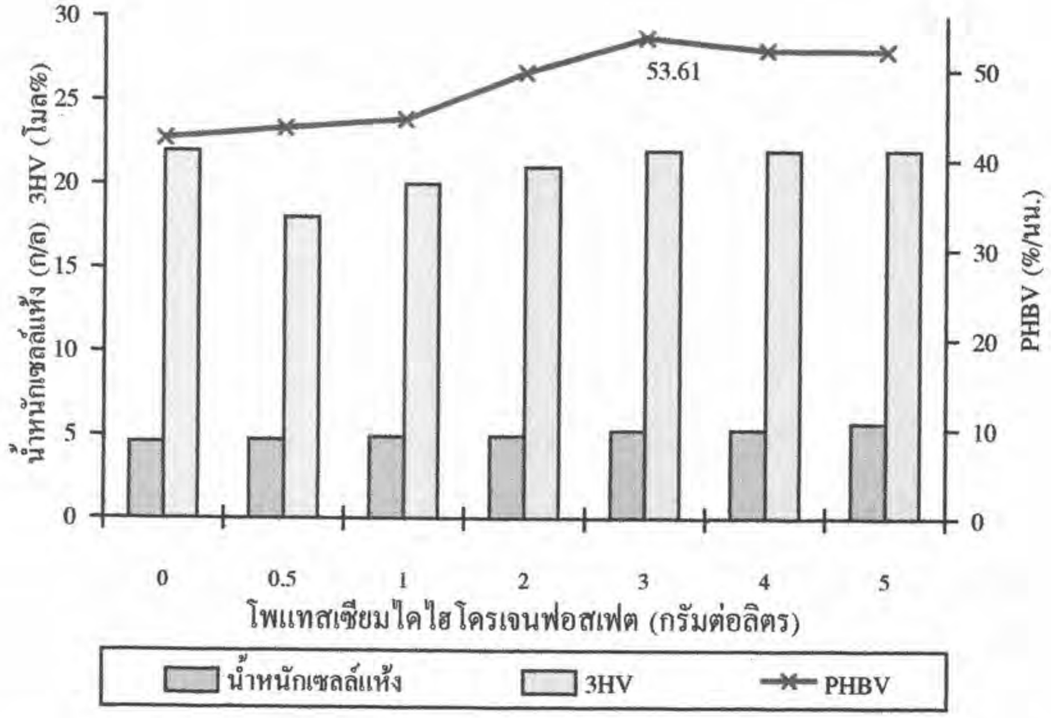
รูปที่ 27 เปรียบเทียบปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV และสัดส่วนของ 3HV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตต่างกัน

3.8.2 ผลของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

ถ่ายกล้าเชื้อของ *Bacillus* sp. BA-019 ลงในอาหารสำหรับการผลิต ตามภาวะที่เหมาะสมตามการวิจัยข้อ 3.7 โดยศึกษาปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เท่ากับ 0 0.5 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 36 และ 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้ ผลการวิจัยดังแสดงในตารางที่ 22 และรูปที่ 28 พบว่า สัดส่วนของ 3HV ที่ได้ใกล้เคียงกันเท่ากับ 18 ถึง 22 โมลเปอร์เซ็นต์ ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงสุด เท่ากับ 53.61 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งสูงสุดเมื่อใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งสูงขึ้นจาก 4.60 ถึง 5.69 กรัมต่อลิตร ตามปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHBV สูงตามปริมาณของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เพิ่มขึ้น โดยสูงสุดเมื่อใช้ในปริมาณ 3 กรัมต่อลิตร ดังนั้น จึงเลือกโพแทสเซียมในรูปโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 3.0 กรัมต่อลิตร สำหรับการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 22 น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBVที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อมีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ปริมาณ 0 ถึง 5 กรัมต่อลิตร

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHBV (%/นน.)	โมโนเมอร์ (โมล%)	
			3HB	3HV
0	4.60	42.44	78	22
0.5	4.73	43.56	82	18
1	4.87	44.50	80	20
2	4.94	49.75	79	21
3	5.27	**53.61**	78	22
4	5.30	52.26	78	22
5	5.69	52.10	78	22



รูปที่ 28 เปรียบเทียบปริมาณและสัดส่วนโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณโพแทสเซียมต่างกัน

3.9 ผลของซับพลีเมนต์ (supplement) ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV

3.9.1 ผลของเกลือของกรดอินทรีย์

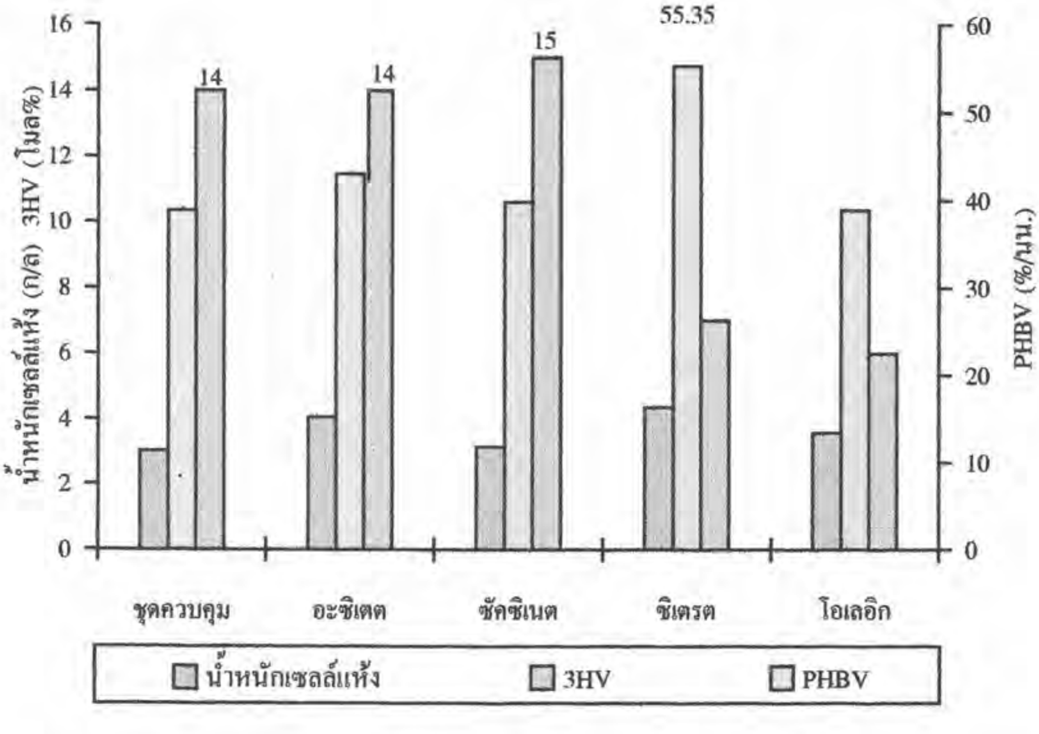
จากการศึกษาการเติมกรดอินทรีย์บางชนิดในอาหารเพื่อการผลิตในผลการวิจัยข้อ 3.4 (ตารางที่ 5) ซึ่งพบว่า การเติมกรดอะซิติก ซิตริก และซัคซินิกมีผลให้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงขึ้น และจากการเปรียบเทียบปริมาณ PHBV ในอาหารที่เติมกรดหรือการเติมในรูปของเกลือโซเดียมในผลการวิจัยข้อ 3.4 (ตารางที่ 6 และ 8) พบว่า การเติมกรดอินทรีย์บางชนิดในรูปของเกลือโซเดียมทำให้ได้ปริมาณ PHBV ที่สูงกว่า การเติมในรูปของกรด Yim และคณะ (1996) ศึกษาผลของการเติมกรดโอเลอิกและ/หรืออะซิติกในการเลี้ยง recombinant *Escherichia coli* ที่ใช้กลูโคสกับโพรพิโอนิก หรือวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เมื่อเติมกรดโอลิอิกทำให้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV เพิ่มขึ้น 4 เท่าเปรียบเทียบกับที่ไม่ได้เติมโอเลอิก ดังนั้นจึงศึกษาผลของโซเดียมอะซิเตต โซเดียมซิเตรต โซเดียมซัคซิเนต และกรดโอลีอิกต่อสัดส่วนและปริมาณของ PHBV

ถ่ายกล้าเชื้อของ *Bacillus* sp. BA-019 ลงในอาหารสำหรับการผลิตตามภาวะที่เหมาะสมตามผลการวิจัยข้อ 3.8 โดยใช้กล้าเชื้อปริมาณ 0.15 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ 75 มิลลิลิตร โดยเติมกรดอินทรีย์ ได้แก่ โซเดียมอะซิเตต โซเดียมซิเตรต โซเดียมซัคซิเนต และกรดโอลิอิก ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 36 และ 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้ ดังแสดงค่าสูงสุดที่วิเคราะห์ได้ในตารางที่ 23 และรูปที่ 29 ผลการวิจัย พบว่า สัดส่วนของ 3HV ในอาหารที่เติมอะซิเตตและซัคซิเนตเท่ากับ 14 และ 15 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมกรด และพบว่าในชุดการทดลองที่เติมโซเดียมซิเตรตและกรดโอเลอิก เชื้อผลิตโมโนเมอร์ของ 3HV ได้น้อยกว่าชุดควบคุม เท่ากับ 7 และ 6 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเติมโซเดียมซิเตรต พบว่า ทำให้เชื้อผลิต PHBV ได้สูงที่สุด (55.35 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 48 ชั่วโมง) รองลงมา ได้แก่ การเติมโซเดียมอะซิเตต (43.00 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุม สำหรับการเติมโซเดียมซัคซิเนตและกรดโอลิอิก พบว่ามีการผลิต PHBV ได้ปริมาณใกล้เคียงกับชุดควบคุม และพบว่า การเติมโซเดียมซิเตรตให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดด้วย (4.36 กรัมต่อลิตร) ซึ่งสูงกว่าชุดที่ไม่ได้เติมซับพลีเมนต์ (3.01 กรัมต่อลิตร) ในอาหารที่เติมเกลือมีผลให้ pH

สุดท้ายสูงกว่าชุดควบคุมเล็กน้อย จากงานวิจัยนี้สรุปว่า โซเดียมซิเตรตมีผลให้การผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV และน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น แต่ได้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ต่ำ

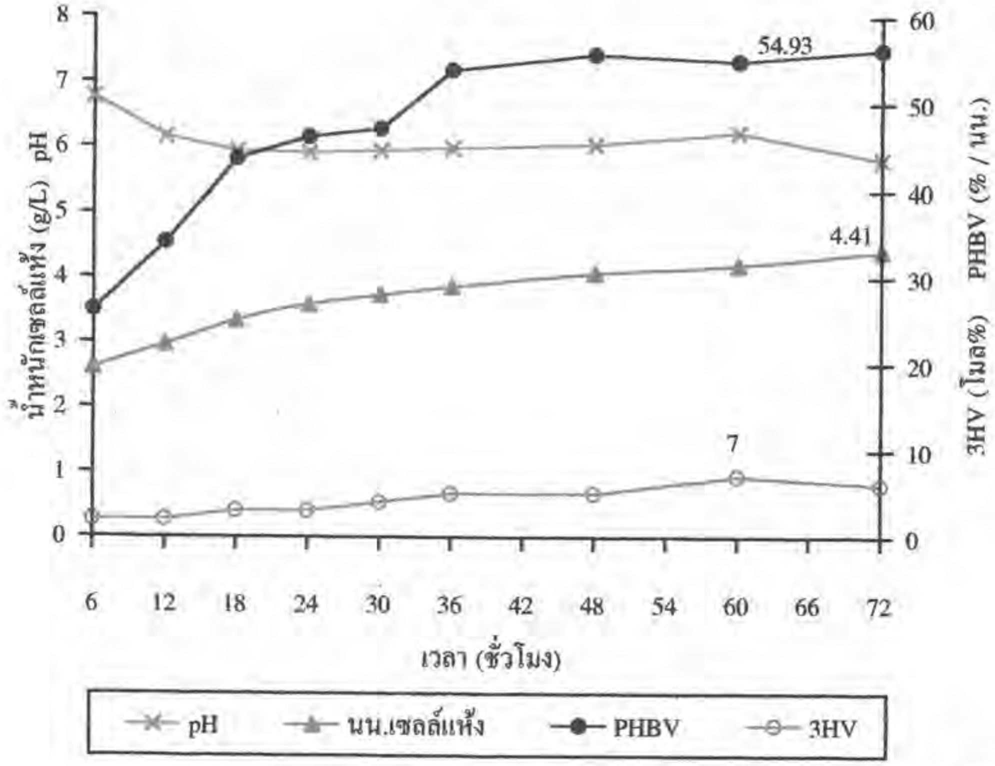
ตารางที่ 23 น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์บางชนิดปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร

เกลือของกรดและกรดอินทรีย์	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHBV (%/นน.)	โมโนเมอร์ (โมล%)	
				3HB	3HV
โซเดียมอะซิเตต	6.33	4.06	43.00	86	14
โซเดียมซิเตรต	6.22	4.36	**55.35**	93	7
โซเดียมซัคซิเนต	5.87	3.14	39.84	85	**15**
โอเลอิก	5.32	3.58	38.87	94	6
ชุดควบคุม (ไม่เติมเกลือหรือกรด)	5.23	3.01	38.85	86	14



รูปที่ 29 เปรียบเทียบสัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารที่เติมเกลือของกรดบางชนิด 1 กรัมต่อลิตร

สรุปผลการวิจัยได้ว่า การเติมโซเดียมซิเตรตลงในอาหารเพื่อการผลิตทำให้ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงกว่าชุดควบคุมและที่เติมเกลือชนิดอื่น โดยสูงสุดที่เวลานานขึ้นเป็น 48 ชั่วโมง และจากผลการทดลองที่ผ่านมา พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อนานขึ้นมีผลให้ได้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV สูงขึ้น จึงเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง โดยเติมโซเดียมซิเตรต 1 กรัมต่อลิตรเป็นซับพลีเมนต์ วัดค่า pH วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้ ทุก 6 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 30 พบว่า ได้โมโนเมอร์ของ 3HV สูงสุดเท่ากับ 7 โมลเปอร์เซ็นต์ และได้น้ำหนักเซลล์แห้งปริมาณใกล้เคียงกับผลการทดลองก่อน จึงสรุปได้ว่าในการเติมซิเตรตเป็นซับสเตรตเสริม เมื่อเพิ่มเวลาการเลี้ยงเชื้อไม่มีผลให้ *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีสัดส่วนของ 3HV เพิ่มขึ้นได้



รูปที่ 30 น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่า pH สัดส่วนของ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารที่เติมโซเดียมซิเตรต

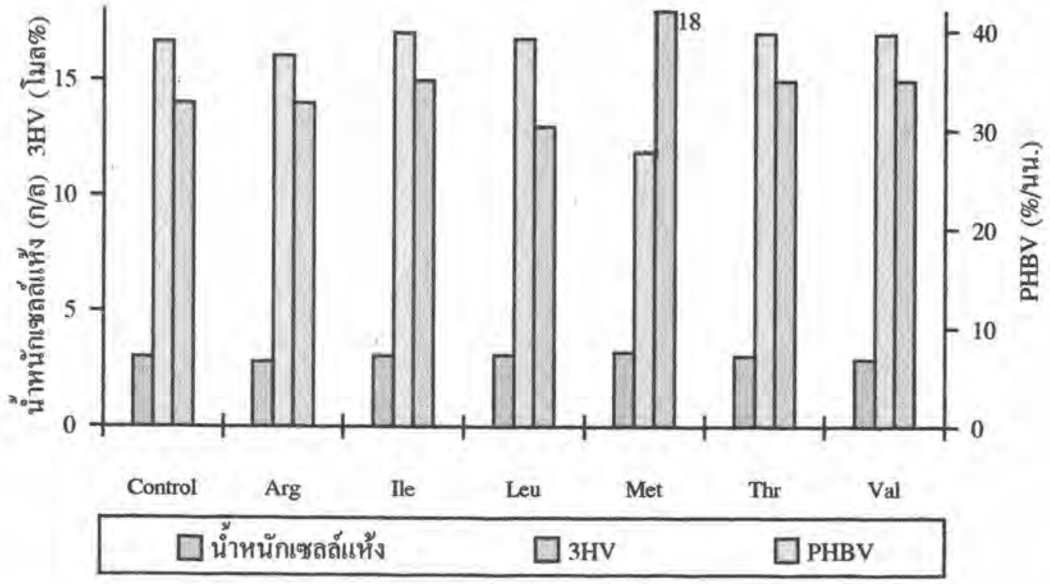
3.9.2 ผลของกรดอะมิโน

Yoon และคณะ (1995) ศึกษาการผลิต PHBV จาก *Alcaligenes* sp. SH-69 ในอาหารที่เติมกรดอะมิโนชนิดต่างๆ พบว่า การเติมทรีโอนีน ไอโซลิวซีนและวาลีนทำให้สัดส่วนของ 3HV สูงขึ้นอย่างชัดเจน คณะผู้วิจัยกลุ่มของ รศ.ดร.สงศรี กุลปรีชา นี้ได้ศึกษาในเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยเติมกรดอะมิโนบางชนิดปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ลิวซีน ไอโซลิวซีน อาร์จินีน และเมทไธโอนีน กระตุ้นการสังเคราะห์ PHB รวมทั้งมีผลให้น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น ในขณะที่พบว่า กรดอะมิโนบางชนิดที่ศึกษา ได้แก่ กรดกลูตามิก กลูตามีน แอสปาติก แอสปาราจีน โปรลีน ไลซีน ทรีโอนีน และซีสเตอีน ไม่มีผลดังกล่าว (ศิรวิทย์ สิตปรีชา, 2541) ในขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาผลของ การเติมอาร์จินีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน เมทไธโอนีน ทรีโอนีนและวาลีนที่มีต่อสัดส่วนและปริมาณของ PHBV

ถ่ายกล้าเชื้อของ *Bacillus* sp. BA-019 ลงในอาหารสำหรับการผลิตโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมผลตามการวิจัยข้อ 3.8 โดยเติมกรดอะมิโน ได้แก่ อาร์จินีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน เมทไธโอนีน ทรีโอนีนหรือวาลีนปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 36 และ 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้ ดังแสดงผลในตารางที่ 24 และรูปที่ 31 พบว่า สัดส่วนของ 3HV ในอาหารที่เติมเมทไธโอนีนเท่ากับ 18 โมลเปอร์เซ็นต์ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นกว่าชุดควบคุม แต่ปริมาณของโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ต่ำกว่าชุดควบคุม และชุดการทดลองที่เติมกรดอะมิโนชนิดอื่น ส่วนการเติมกรดอะมิโนชนิดอื่น พบว่า ผลิตได้โคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีโมโมเมอร์ 3HV สัดส่วนเท่ากับ 13 ถึง 15 โมลเปอร์เซ็นต์ซึ่งใกล้เคียงกับชุดควบคุม รวมทั้งปริมาณ PHBV ที่ผลิตได้ก็ใกล้เคียงกับชุดควบคุม น้ำหนักเซลล์แห้งในทุกชุดการทดลองใกล้เคียงกัน จากงานวิจัยนี้สรุปว่า เมธไทโอนีนมีผลทำให้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV เพิ่มสูงขึ้น

ตารางที่ 24 น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเติมกรดอะมิโนบางชนิดปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรดอะมิโน (50 มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHBV (%/นน.)	สัดส่วน (โมล%)	
			3HB	3HV
อาร์จีนีน	2.80	37.46	86	14
ไอโซลิวซีน	3.05	39.79	85	15
ลิวซีน	3.11	39.20	87	13
เมธไทโอนีน	3.23	27.76	82	18
ทรีโอนีน	3.06	39.74	85	15
วาลีน	2.92	39.70	85	15
ชุดควบคุม (ไม่เติมกรดอะมิโน)	3.01	38.85	86	14

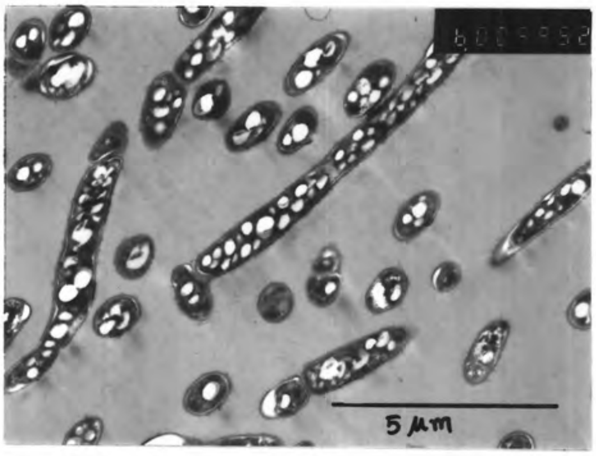


รูปที่ 31 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารที่เติมกรดอะมิโน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากผลการวิจัยการเติมกรดอะมิโน พบว่า เมทไธโอนีนมีผลทำให้การผลิตโมโนเมอร์ของ 3HV เพิ่มขึ้น และจากผลการวิจัยข้อ 3.9.1 โซเดียมซิเตรตมีผลทำให้ปริมาณ PHBV และน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น แต่ได้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม จึงนำผลการทดลองทั้งสองนี้มาศึกษาร่วมกัน โดยเติมโซเดียมซิเตรต 1 กรัมต่อลิตรร่วมกับเมทไธโอนีน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อศึกษาผลที่มีต่อสัดส่วนและปริมาณของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ผลการวิจัย พบว่า ได้สัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 14 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำกว่าการเติมเมทไธโอนีน แต่สูงกว่าการเติมเพียงโซเดียมซิเตรต ส่วนปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงสุดเท่ากับ 41.16 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 36 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสูงกว่าการเติมเมทไธโอนีนเพียงอย่างเดียว แต่ต่ำกว่าเมื่อเติมโซเดียมซิเตรตเพียงอย่างเดียว

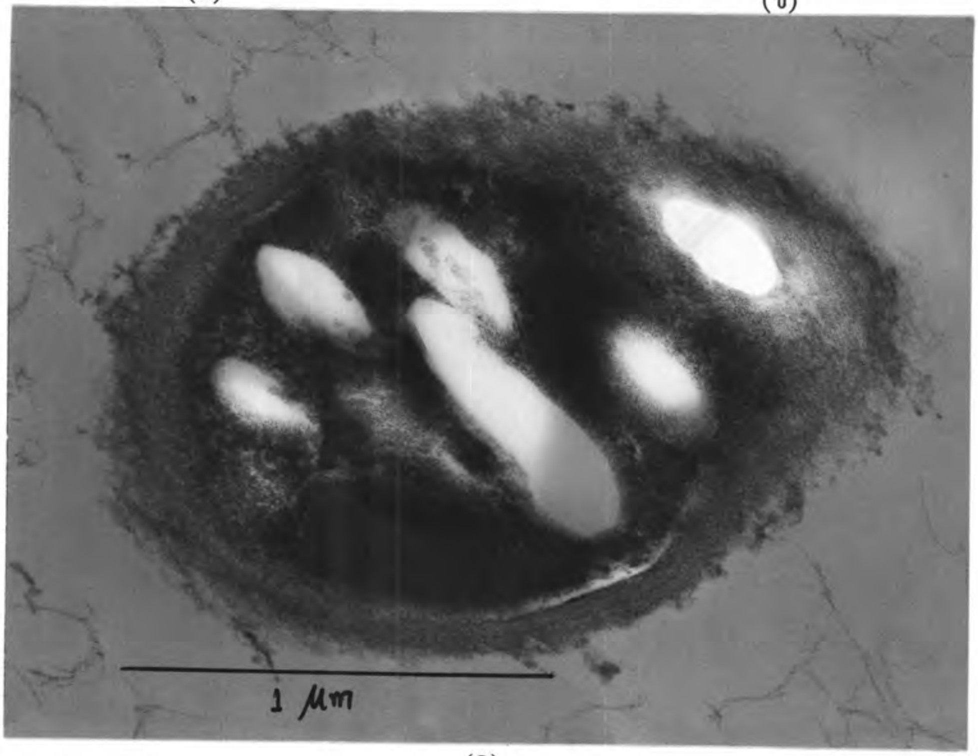
3.10 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus* sp. BA-019 ที่สะสม PHA เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

การศึกษาลักษณะของพอลิเมอร์ PHA ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่าน (Tranmission Electron Microscope : TEM) เพื่อให้เห็นตำแหน่งและลักษณะของแกรนูลของ PHA ภายในเซลล์ โดยเตรียมตัวอย่างเซลล์ที่มีการผลิต PHA ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 2.21 จากรูปที่ 32 พบว่า ภายในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 สะสมพอลิเมอร์ในรูปของแกรนูลซึ่งมีลักษณะใส กระจายตัวเป็นจำนวนมากอยู่ทั่วไป เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Dawes และ Senior (1973) ที่เปรียบเทียบลักษณะเซลล์ *Hydrogenomonas eutropha* H16 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่าน ในช่วงที่มีและไม่มีการสะสมพอลิเมอร์ และภาพการเปรียบเทียบลักษณะเซลล์ของ *Alcaligenes* sp. A-04 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่านในช่วงที่มีและไม่มีการสะสมพอลิเมอร์ ของ อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) แสดงว่า ลักษณะแกรนูลที่โปร่งแสงนั้นคือแกรนูลของพอลิเมอร์ที่สะสมอยู่ในเซลล์ โดยจะเบียดบังออร์กาเนล (organelle) อื่น ๆ ภายในเซลล์



(ก)

(ข)

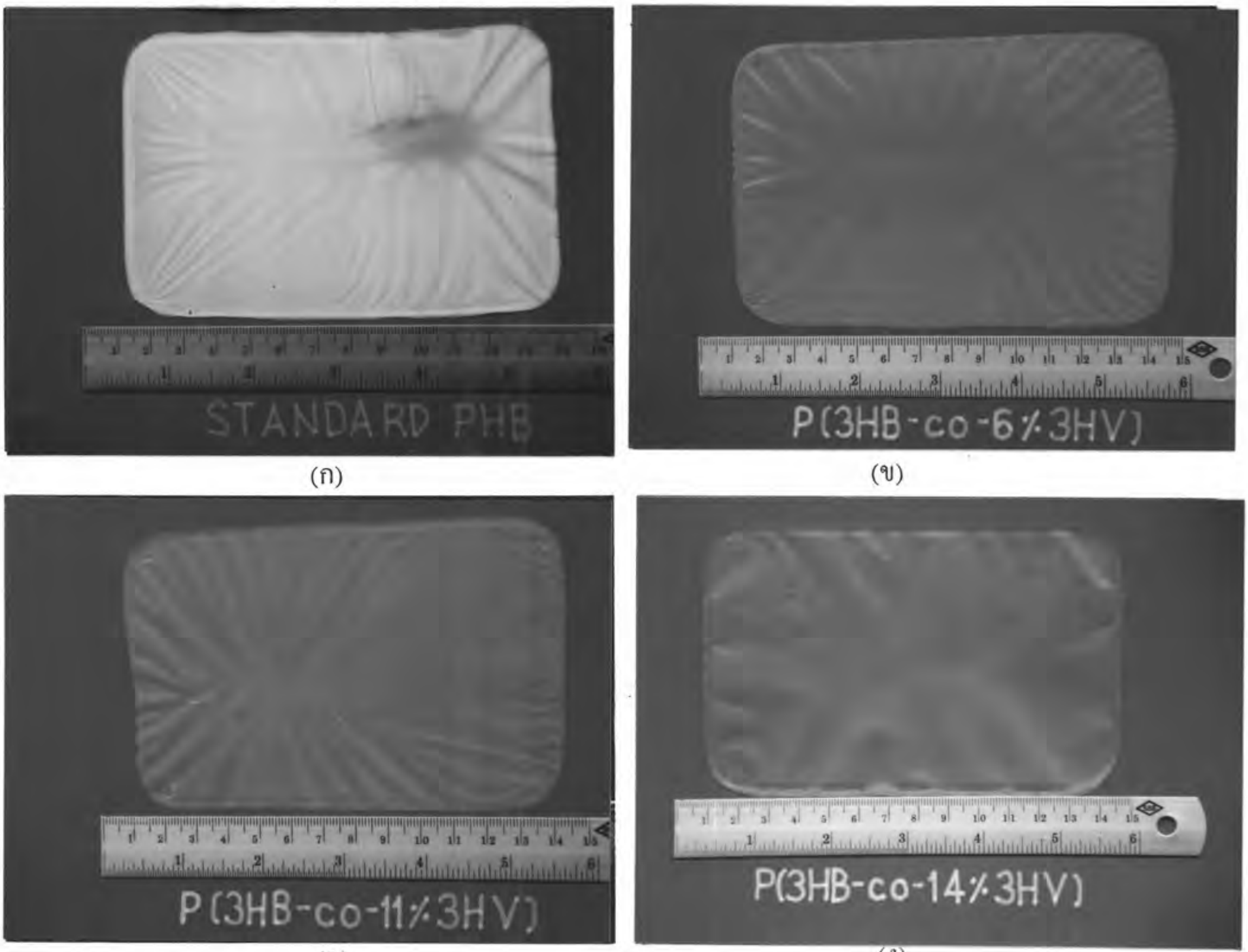


(ค)

รูปที่ 32 เซลล์ของ *Bacillus* sp. BA-019 ที่แสดงลักษณะแกรนูลของ PHA จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตนาน 48 ชั่วโมง ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ก) กำลังขยาย 9,000 เท่า (ข) กำลังขยาย 24,000 เท่า และ (ค) กำลังขยาย 55,500 เท่า

3.11 ลักษณะพอลิเมอร์

โคพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อผ่านการสกัดตามวิธีข้อ 2.22 มีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 33 โดยพบว่า เมื่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV เพิ่มขึ้น (จาก 6 ถึง 14 โมลเปอร์เซ็นต์ รูปที่ 33 (ข) (ค) และ (ง)) ทำให้โคพอลิเมอร์ที่ได้มีลักษณะที่ใสขึ้น ส่วนสารมาตรฐานโฮโมพอลิเมอร์ PHB (รูปที่ 33(ก)) มีลักษณะขาวขุ่น



รูปที่ 34 ลักษณะพอลิเมอร์ (ก) โฮโมพอลิเมอร์ PHB (ข) โคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 6 โมลเปอร์เซ็นต์ (ค) โคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 11 โมลเปอร์เซ็นต์ (ง) โคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 14 โมลเปอร์เซ็นต์