บทที่ 3

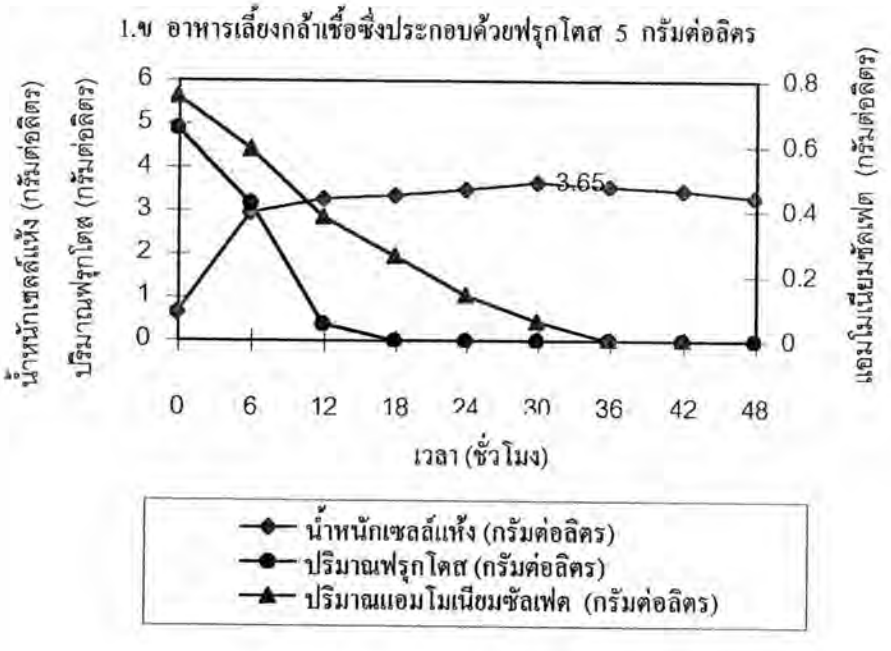
ผลการทดลอง

3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 เพื่อให้เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV)

เนื่องจากเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA- 019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ เซลล์ที่ได้ยังมีปริมาณไม่เพียงพอสำหรับการนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในขั้นตอนการผลิตโคพอลิเมอร์ เนื่องจากแหล่งคาร์บอนสำหรับการสร้างโมโนเมอร์ 3HV ที่ใช้เป็นกรดอินทรีย์ พบว่าเซลล์มีการเติบโตน้อยในอาหารสำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์ ดั้งนั้นจำเป็นต้องใช้กล้าเชื้อปริมาณมากในขั้นตอนการผลิต ดังนั้นจึงได้เติมน้ำตาลฟรุกโตสลงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ เพื่อให้ได้เซลล์ปริมาณมากขึ้น

3.1.1 การเตรียมกล้าเชื้อเพื่อให้ได้เซลล์ปริมาณมากสำหรับการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์

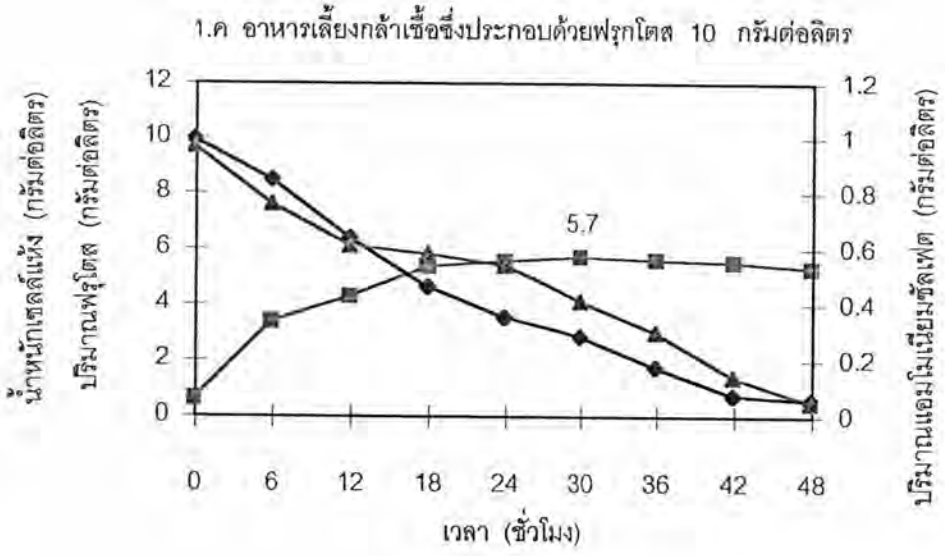
เนื่องจากอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อสูตรที่แสดงตามข้อ 2.3.2 ซึ่งไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบทำให้ได้ปริมาณเซลล์น้อย ในขั้นตอนการผลิตต้องใช้กล้าเชื้อปริมาณมาก และได้สังเกตพบว่าเซลล์มีการเติบโตน้อยหรือเกือบไม่มีการเติบโตจึงจำเป็นต้องใช้กล้าเชื้อปริมาณมาก ดังนั้นได้ศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโตส 5 10 และ 15 กรัมต่อลิตร โดยเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่ไม่มีน้ำตาลฟรุกโตสเป็นองค์ประกอบ(ชุดควบคุม) ติดตามการเติบโตทุก 6 ชั่วโมง นาน 48 ชั่วโมง ผลการทดลองดังในรูปที่ 3.1 ก ข ค และ ง พบว่าเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อชุดควบคุมได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.18 กรัมต่อลิตร (ในชั่วโมงที่ 36) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่มีฟรุกโตสเป็นองค์ประกอบปริมาณ 5 10 และ 15 กรัมต่อลิตรได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.65 5.70 และ 5.55 (ในชั่วโมงที่ 30) ตามลำดับ ดังนั้นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อซึ่งประกอบด้วยปริมาณฟรุกโตสที่เหมาะสมเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร การศึกษาในขั้นต่อไปเพื่อหาอายุกล้าเชื้อที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงและมีปริมาณโคพอลิเมอร์สูง โดยเลือกกล้าเชื้ออายุ 18 24 30 และ 36 ชั่วโมง เพื่อศึกษาต่อไป

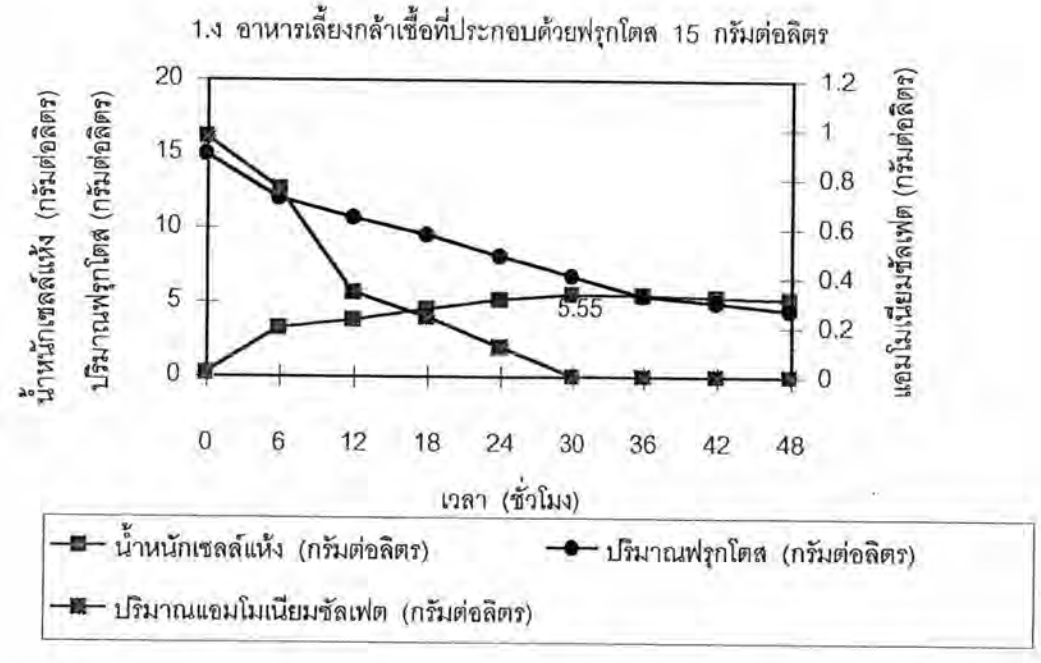


รูปที่ 1. ก-ข เปรียบเทียบการเติบโต ปริมาณแอมโมเนียมซัลและปริมาณฟรุกโตสที่เหลือ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ

อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อชุดควบคุม

อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อซึ่งประกอบด้วยฟรุกโตส 5 กรัมต่อลิตร





รูปที่ 1. ค-ง เปรียบเทียบการเติบโต ปริมาณฟรุกโตสและปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ใน

อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อซึ่งประกอบด้วยฟรุกโตสปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร

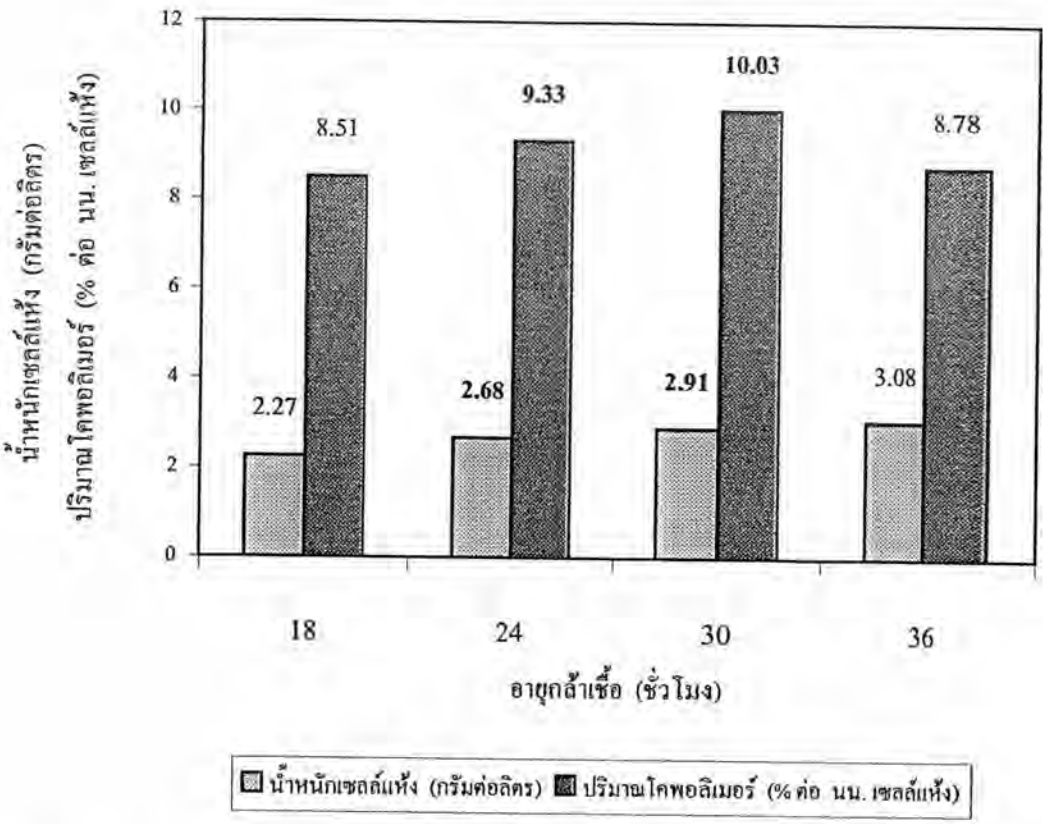
อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อซึ่งประกอบด้วยฟรุกโตสปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร

3.1.2 การศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์

รัตนศิริ มุทิตากุล (2538) พบว่าซูโครสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Bacillus* sp. BA- 019 และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1.0 กรัมต่อลิตร ส่วนการผลิตโคพอลิเมอร์นั้นจำเป็นต้องใช้แหล่งคาร์บอนผสมซึ่งชนิดหนึ่งจะเป็นกรดอินทรีย์ เช่น กรดวาเลอริก เพื่อเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสร้างโมโนเมอร์ 3HV ดังนั้นในขั้นตอนการผลิตโคพอลิเมอร์ พบว่าเชื้อมีการเติบโตได้น้อยหรือเกือบไม่มีการเติบโตเลย จึงจำเป็นที่จะต้องใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีความเหมาะสมสำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์ เลี้ยง *Bacillus* sp.BA- 019 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อจากข้อ 2.5.3 เลือกกล้าเชื้ออายุต่าง ๆ (18 24 30 และ 36 ชั่วโมง) ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ ซึ่งประกอบด้วยกรดโพรพิโอนิก 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน จากรายงานของ Doi และคณะ (1986) พบว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดวาเลอริก เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) โดยที่กรดทั้ง 2 ชนิดสามารถเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสร้างโมโนเมอร์ทั้ง 3HB และ 3HV ในการทดลองนี้เลือกใช้กรดโพรพิโอนิก เนื่องจากเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA- 019 โดยใช้กรดวาเลอริกได้น้ำหนักเซลล์แห้งน้อยกว่าเมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอน (ไม่ได้แสดงข้อมูล) อาจเนื่องจากกรดวาเลอริกมีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่ากรดโพรพิโอนิก โดยใช้ปริมาณกล้าเริ่มต้นเท่ากับ 0.6 กรัม (น้ำหนักเซลล์เปียก) ต่อ 50 มิลลิลิตร (อาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งได้จากรายงานการวิจัยของ อัญชนา ศุรติขจร (2537) ติดตามการเติบโตทุก 24 ชั่วโมง นาน 72 ชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้แสดงในตารางที่ 3.1 และรูปที่ 3.2 พบว่าเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้กล้าเชื้ออายุ 30 ชั่วโมง เชื้อสามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB-co-3HV) ได้เท่ากับ 10.03 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (ในชั่วโมงที่ 48) ซึ่งเป็นปริมาณสูงที่สุด ในขณะที่กล้าเชื้ออายุ 18 24 และ 36 ชั่วโมง ให้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 8.51 9.33 และ 8.78 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ค่าพีเอชของน้ำหมักของทุกตัวอย่างมีค่าที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกกล้าเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง เนื่องจากได้น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าใกล้เคียงกันกับเมื่อใช้กล้าเชื้ออายุ 30 ชั่วโมง (2.68 และ 2.91 กรัมต่อลิตร) แม้ว่าปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ได้เมื่อใช้กล้าเชื้ออายุ 30 ชั่วโมง จะสูงกว่าเล็กน้อย (10.03 และ 9.33 กรัมต่อลิตร) แต่เมื่อใช้กล้าเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณโคพอลิเมอร์ที่เวลาเพียง 24 ชั่วโมง แต่เมื่อใช้กล้าเชื้ออายุ 30 ชั่วโมงแม้ว่าได้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงกว่าเล็กน้อย แต่ต้องใช้เวลาการเลี้ยงเชื้อนาน 48 ชั่วโมง นอกจากนั้นกล้าเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ยังอยู่ในระยะ log phase ซึ่งเซลล์มีแอคติวิตีที่สูงกว่ากล้าเชื้ออายุ 30 ชั่วโมงซึ่งอยู่ในช่วง stationary phase (กราฟรูปที่ 3.1.ค)

ตารางที่ 3.1 การแปรผันอายุกล้าเชื้อของ *Bacillus* sp. BA-019 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ ที่มีกรดโพรพิโอนิก 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.11 กรัมต่อปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร

อายุกล้าเชื้อ (ชั่วโมง)	เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PH	ปริมาณP(3HB-co-3HV)		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
				% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV
18	24	2.27	5.97	8.51	0.19	34	66
	48	2.06	5.89	6.48	0.13	35	65
	72	1.96	5.95	4.12	0.08	36	66
24	24	**2.68**	5.95	**9.33**	**0.24**	39	61
	48	2.26	5.99	7.08	0.16	38	62
	72	2.20	5.89	4.09	0.08	36	64
30	24	**2.91**	5.99	9.61	**0.28**	37	63
	48	2.51	5.93	**10.03**	0.25	35	65
	72	2.39	5.96	5.65	0.13	33	67
36	24	3.08	5.99	8.78	0.27	39	61
	48	2.91	5.91	8.16	0.23	36	64
	72	2.63	5.92	4.94	0.12	35	65



รูปที่ 3.2 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดที่ได้เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019ในอาหาร MSM ซึ่งมีกรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อแปรผันอายุกล้าเชื้อ เมื่อแปรผันอายุกล้าเชื้อ

3.1.3 การเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ เมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอน

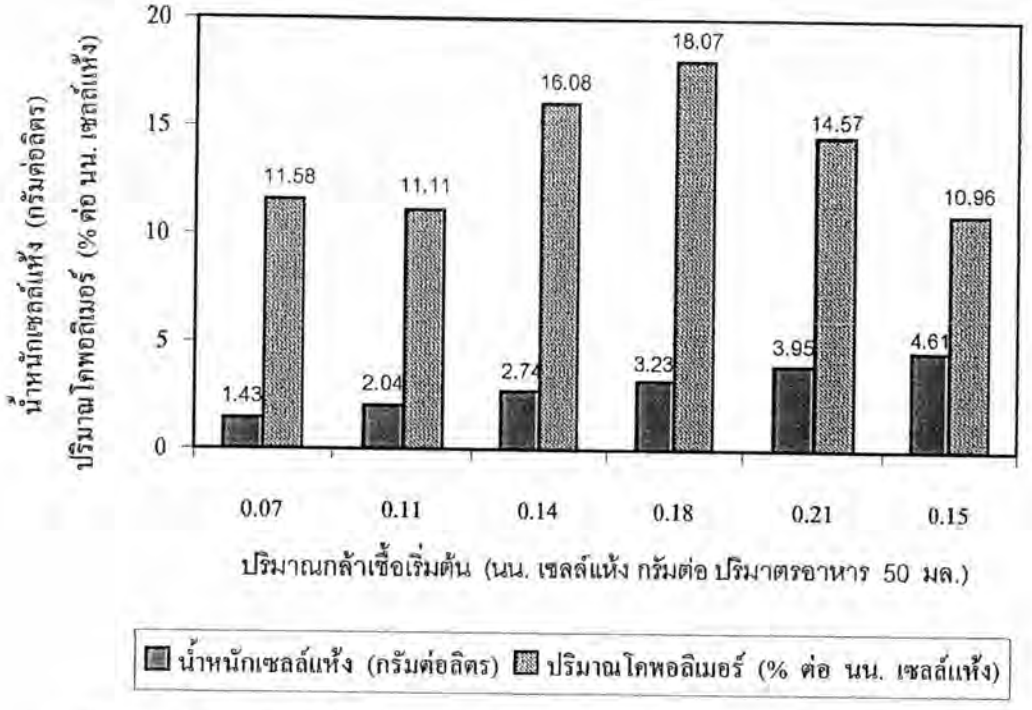
Doi และคณะ (1986 , 1988) ได้รายงานว่าการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ใน *Alcaligenes* cutrophus ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมเท่ากับ 0.2 –0.4 กรัม (น้ำหนักเซลล์เปียก) ต่อปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร ทั้งนี้เนื่องจากอาหารเพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์มีกรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนผสมทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าพีเอชค่อนข้างเป็นกรด จึงจำเป็นต้องใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีปริมาณมากเพียงพอที่เซลล์จะเติบโตต่อไปได้ เพื่อให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูง เนื่องจากโคพอลิเมอร์เป็นสารผลิตภัณฑ์ที่ถูกสังเคราะห์และสะสมภายในเซลล์ ปริมาณโคพอลิเมอร์(เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และกรัมต่อลิตร) จึงขึ้นอยู่กับปริมาณเซลล์ทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงได้ ในปี 2537 อัญชนา ศุรติขจร ได้รายงานปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมเท่ากับ 0.6 กรัม(น้ำหนักเซลล์เปียก) ต่อปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร ในการสร้างและสะสมโคพอลิเมอร์ของ *Alcaligenes* sp. A-04 จากผลการศึกษาชนิดของกรดอินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) พบว่าเมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอน *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ได้ปริมาณสูงสุด ดังนั้นในการศึกษาขั้นตอนนี้ได้เลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ที่มีกรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนได้แปรผันปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 0.07 0.11 0.14 0.18 0.21 และ 0.25 กรัม (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ต่อ 50 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ และเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานาน 36 ชั่วโมง

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.2 และรูปที่ 3.3 พบว่าเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-19 ที่มีปริมาณกล้าเชื้อเท่ากับ 0.18 กรัมต่อ 50 มิลลิลิตร ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.23 กรัมต่อลิตร และปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ 18.07 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (คิดเป็น 0.58 กรัมต่อลิตร) ซึ่งปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ได้สูงกว่าปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีน้ำหนักเซลล์เปียกเท่ากับ 0.07 0.11 0.14 0.21 และ 0.25 กรัมต่อ 50 มิลลิลิตร และพบว่าสัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HB และ 3HV ที่ได้เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อต่างกันมีค่าที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นในงานวิจัยขั้นตอนต่อไปจึงใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.18 กรัมต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร

จากผลการศึกษาการใช้กรดโพรพิโอนิกในผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ยังไม่สูงพอ จึงต้องการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนผสมชนิดอื่น เพื่อให้เชื้อมีการเติบโตได้ดีขึ้นโดยเลือกแหล่งคาร์บอนที่มีราคาต่ำเท่าที่จะเป็นไปได้ โดยแหล่งคาร์บอนที่เลือกใช้ควรทำให้เชื้อมีการเติบโตดี สามารถเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์โมโนเมอร์ของ 3HB และ3HV ได้ด้วย

ตารางที่ 3.2 เปรียบเทียบการเติบโตและปริมาณโคพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์และสะสมโดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อแปรผันปริมาณกล้าเชื้อ โดยใช้กล้าเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ที่มีกรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอน

ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น (นน. เซลล์แห้งกรัมต่อ 50 มล.)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	pH	ปริมาณ P(3HB-co-3HV)		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
			% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV
0.07	1.43	5.94	11.58	0.17	35	65
0.11	2.04	5.95	11.11	0.23	38	62
0.14	2.74	5.97	16.08	0.44	36	64
0.18	**3.23**	5.93	**18.07**	**0.58**	**35**	**65**
0.21	3.95	5.94	14.57	0.57	35	65
0.25	4.61	5.98	10.96	0.50	37	63



รูปที่ 3.3 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์และสะสมโดย *Bacillus* sp. BA-019 ที่มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นต่างกัน เมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอน

3.2 การศึกษาชนิดของกรดอินทรีย์เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์

จากการทบทวนเอกสารงานวิจัยเรื่องการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) พบว่าส่วนใหญ่แหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นกรดอินทรีย์ เช่น กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก และกรดวาเลอริก เป็นต้น จากงานวิจัยของ เลี้ยง *Bacillus* sp. BA – 019 ในอาหารเพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ (ตามวิธีข้อ 3.5) ที่ใช้กรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 36 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกชนิดกรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนที่สร้างโมโนเมอร์ของ 3HB และ 3HV ซึ่งจะนำไปเป็นแหล่งคาร์บอนผสมกับน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV)

ผลการทดลองพบว่า *Bacillus* sp. BA – 019 สามารถสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอน โดยได้ปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ 17.30 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้กรดบิวทิริกและกรดวาเลอริก ได้เท่ากับ 16.91 และ 16.23 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ส่วนเมื่อใช้กรดอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้แก่ กรดอะซิติก กรดแลคติก กรดกลูโคนิก และกรดซอร์บิค และเกลือของอินทรีย์ ได้แก่ โซเดียมอะซิเตท โซเดียมซัคซิเนท และ โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท พบว่าได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ต่ำกว่าดังแสดงผลในตารางที่ 3.3 ดังนั้นจึงเลือกกรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก และ กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ของ *Bacillus* sp. BA – 019ต่อไป ทั้งนี้พบว่าเมื่อใช้กรดวาเลอริก *Bacillus* sp. BA – 019 สังเคราะห์และสะสม P(3HB-co-3HV) ได้สัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV สูงสุดเท่ากับ 70 โมลเปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริกสัดส่วนของ 3HV ได้เท่ากับ 60 และ 25 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกรดอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เช่น กรดอะซิติก และโซเดียมซัคซิเนต ถึงแม้ว่าจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งอยู่ในเกณฑ์สูงคือ 3.06 และ 3.03 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณโคพอลิเมอร์ (เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) และสัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV ต่ำกว่า ส่วนค่าพีเอชของน้ำหมักพบว่าค่าพีเอชของน้ำหมักในตัวอย่างที่ใช้กรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่าพีเอชต่ำที่สุดเท่ากับ 4.75 และค่าพีเอชของน้ำหมักที่มีค่าสูง (8.64 และ 8.63) พบในตัวอย่างที่แหล่งคาร์บอนเป็นกรดซัคซินิกและโซเดียม-ซัคซิเนต

ตารางที่ 3.3 การใช้กรดอินทรีย์และเกลือของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ โดย *Bacillus* sp. BA- 019

แหล่งคาร์บอน (20 กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PH	ปริมาณ P(3HB-co-3HV)		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
			% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV
กรดอะซิติก	3.06	5.59	13.37	0.42	94	6
กรดแลคติก	2.55	4.75	12.16	0.31	91	9
กรดกลูโคนิก	2.87	6.65	10.43	0.29	87	13
กรดซอร์บิค	2.53	5.73	3.31	0.08	94	6
กรดซัคซินิค	2.37	8.64	5.03	0.16	85	15
กรดโพรพิโอนิก	**3.11**	5.93	**17.30**	**0.58**	**40**	**60**
กรดบิวทิริก	**2.98**	5.91	**16.91**	**0.47**	**75**	**25**
กรดวาเลอริก	**2.65**	5.78	**16.23**	**0.43**	**30**	**70**
โซเดียมอะซิเตท	2.50	5.93	8.49	0.21	95	5
โซเดียมซัคซิเนท	3.03	8.63	5.53	0.16	84	16
โซเดียม-4- ไฮดรอกซีบิวทิเรท	2.59	6.55	7.81	0.20	91	9

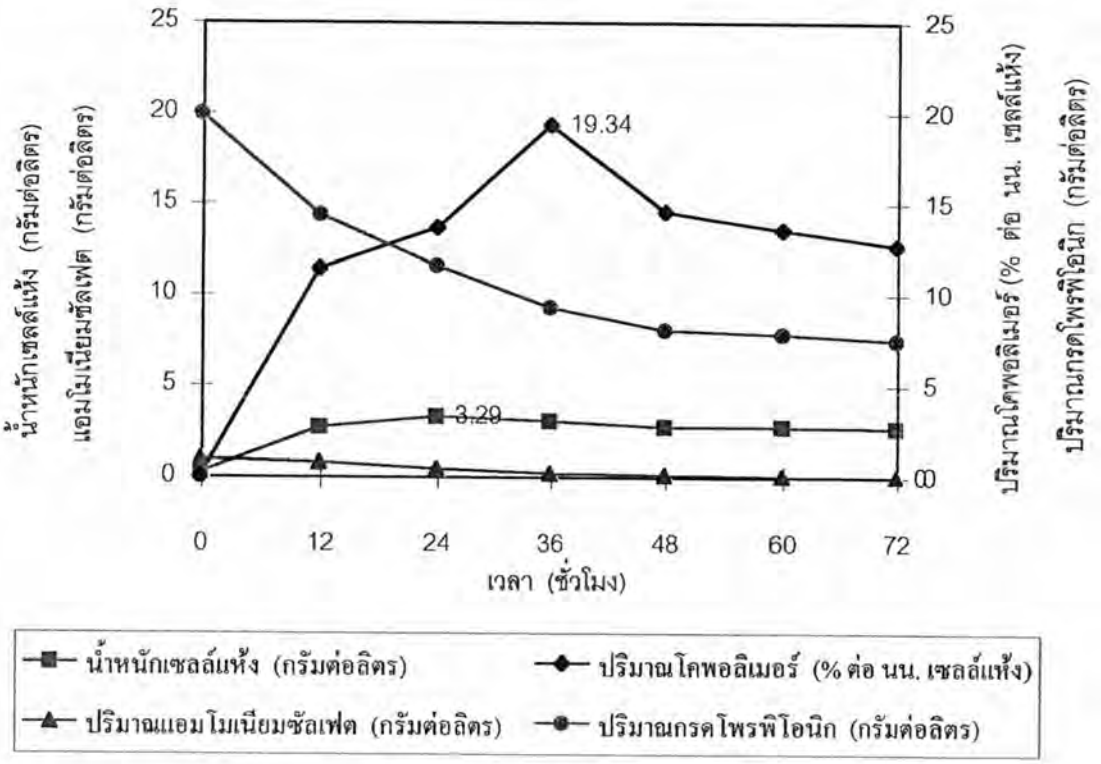
3.3 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเติบโต การสังเคราะห์สะสมโคพอลิเมอร์

Sonnleitner และคณะ (1979) รายงานการสังเคราะห์ PHB โดย *Alcaligenes eutrophus* H16 พบว่าการเปลี่ยนแปลงการเติบโตและการสังเคราะห์ PHB แบ่งเป็น 3 ระยะ คือ ระยะการเติบโตของเซลล์ซึ่งควบคู่ไปกับการสังเคราะห์ PHB ระยะของการเพิ่มปริมาณ PHB ในขณะที่ปริมาณโปรตีนและองค์ประกอบของเซลล์คงที่ และระยะที่มีการสะสมปริมาณ PHB สูงสุด จากรายงานการวิจัยของ Doi และคณะ (1986, 1987 และ 1988) และ Kunioka และคณะ (1989) ได้รายงานการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์สูงสุดโดย *Alcaligenes eutrophus* เมื่อใช้กรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 48 ชั่วโมง อัญชนา ศุรติขจร (2537) ได้รายงานเวลาการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ของ *Alcaligenes* sp. A-04 ที่เวลา 60 ชั่วโมง งานวิจัยนี้ได้ทำการวิจัยเพื่อหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ โดย *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ที่มีกรดโพรพิโอนิก 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและมีแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 0.6 กรัม(น้ำหนักเซลล์เปียก)ต่อปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 (รัตนศิริ มุฑิตากุล , 2538) ติดตามการเติบโตทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ผลการทดลองที่ได้แสดงในตารางที่ 3.4 และรูปที่ 3.4 พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง *Bacillus* sp. BA – 019 มีการเติบโตได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.29 กรัมต่อลิตร แต่ที่เวลา 36 ชั่วโมง ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดคือ 19.34 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งหรือ 0.59 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ในชั่วโมงที่ 36-72ใกล้เคียงกันและมีแนวโน้มลดลง รวมทั้งปริมาณการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ก็ค่อย ๆ ลดลงเป็นลำดับ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือพบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 48 มีปริมาณน้อยมาก ค่าพีเอชของน้ำหมักมีค่าใกล้เคียงกันและลดลงเล็กน้อยหลังจาก 36 และ 72 ชั่วโมง พบว่าสัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV เพิ่มขึ้นตามเวลาของการเลี้ยงเชื้อคือที่ 12 24 และ 36 ชั่วโมง (ประกอบด้วย 3HV เท่ากับ 38 43 และ 68 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) หลังจากนั้นสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ค่อนข้างคงที่ ในการศึกษาขั้นตอนต่อไปจึงเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 36 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์และน้ำหมักมาวิเคราะห์ข้อมูลต่าง ๆ

ตารางที่ 3.4 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกและปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือ ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนโมโนเมอร์ ที่สังเคราะห์และสะสมโดย *Bacillus* sp. BA- 019 ที่เวลาต่าง ๆ เมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	แอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	pH	ปริมาณ P(3HB-co-3HV)		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
					% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV
0	1.76	19.96	0.98	5.97	-	-	-	-
12	2.71	14.38	0.79	5.95	11.43	0.31	62	38
24	3.29	11.57	0.45	5.91	13.67	0.45	58	42
36	**3.05**	9.31	0.21	5.86	**19.34**	**0.59**	32	68
48	2.75	8.06	0.13	5.82	14.54	0.40	31	69
60	2.73	7.84	0.04	5.83	13.55	0.37	30	70
72	2.68	7.52	0.00	5.85	12.68	0.34	31	69



รูปที่ 3.4 การเติบโต ปริมาณกรดโพรพิโอนิกและปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือ และปริมาณโคพอลิเมอร์ ที่สังเคราะห์และสะสมโดย *Bacillus* sp. BA-19 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอน

3.4 การศึกษาแหล่งคาร์บอนผสมเพื่อการเติบโต สังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV)

3.4.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทรายขาวกับกรดอินทรีย์ (กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก และ กรดวาเลอริก) เพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์

เนื่องจาก *Bacillus* sp. BA-019 สามารถใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีในการสังเคราะห์และสะสม PHB (รัตนศิริ มุฑิตากุล, 2537) แต่เนื่องจากน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์มีราคาแพง จึงเปลี่ยนมาใช้น้ำตาลทรายขาวที่มีราคาถูกกว่าหลายเท่า ผลการวิเคราะห์น้ำตาลทรายขาว ด้วยวิธี HPLC พบว่าประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสเพียงชนิดเดียวโดยแสดงข้อมูลในภาคผนวก ง ในการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) จึงเลือกใช้น้ำตาลทรายขาวเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการสร้าง 3HB และใช้กรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการสร้าง 3HV ดังนั้นการทดลองนี้จึงเป็นการใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทรายขาวกับกรดอินทรีย์ 3 ชนิดที่ได้คัดเลือกจากการศึกษาข้อ 3.1.3 โดยศึกษาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ได้ รวมทั้งสัดส่วนระหว่างโมโนเมอร์ของ 3HB และ 3HV

เลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 เพื่อสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ (ตามวิธีการทดลองข้อ 2.5.5 และข้อ 2.8.1) โดยศึกษาเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนผสมที่ใช้ดังนี้

ก. อาหารเพื่อการผลิตมีน้ำตาลทรายขาว 19 18 17 16 15 13 และ 10 กรัมต่อลิตรผสมกับกรดโพรพิโอนิก 1 2 3 4 5 7 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร)

ข. อาหารเพื่อการผลิตมีน้ำตาลทรายขาว 19 18 17 16 15 13 และ 10 กรัมต่อลิตรผสมกับกรดบิวทิริก 1 2 3 4 5 7 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร)

ค. อาหารเพื่อการผลิตมีน้ำตาลทรายขาว 19 18 17 16 15 13 และ 10 กรัมต่อลิตรผสมกับกรดวาเลอริก 1 2 3 4 5 7 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร)

โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน

ตรวจหาการเติบโต ปริมาณโคพอลิเมอร์ สัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ ปริมาณแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดที่เหลือ และค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก ที่เวลา 36 ชั่วโมง ผลการทดลอง (ดังแสดงในตารางที่ 3.5 5 ก ข และ ค และรูปที่ 3.5) ได้พบว่าเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นกรดโพรพิโอนิก 4 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลทรายขาว 16 กรัมต่อลิตร ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.20 กรัมต่อลิตร และปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ 34.68 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นกรดบิวทิริก 1 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลทรายขาว 19 กรัมต่อลิตรได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.14 กรัมต่อลิตร และ

ปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ 39.17 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และแหล่งคาร์บอนผสมเป็นกรดวาเลอริก 2 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลทรายขาว 18 กรัมต่อลิตร ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.14 กรัมต่อลิตร และปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ 12.40 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในอาหารที่ประกอบน้ำตาลทรายขาว 19 กรัมต่อลิตรและกรดบิวทิริก 1 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณน้ำตาลทรายขาวและกรดบิวทิริกที่เหลือเท่ากับ 3.25 และ 0.57 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่าพีเอชของน้ำหมักลดลงจากค่าพีเอชเริ่มต้น (6.0) เล็กน้อย และค่าใกล้เคียงกันในทุกตัวอย่าง พบว่าแหล่งคาร์บอนผสมที่ทำให้ *Bacillus* sp. BA-019 สังเคราะห์และสะสม P(3HB-co-3HV) ได้ปริมาณสูงสุดนั้น ได้แก่แหล่งคาร์บอนที่ประกอบด้วยกรดบิวทิริกกับน้ำตาลทรายขาว (39.17 เปอร์เซ็นต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) รองลงมาได้แก่ แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดโพรพิโอนิกกับน้ำตาลทรายขาว และกรดวาเลอริกกับน้ำตาลทรายขาว ตามลำดับ และได้พบว่าแหล่งคาร์บอนผสมที่ประกอบด้วยกรดวาเลอริกได้สัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV สูงสุด (30 โมลเปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก ซึ่งเท่ากับ 22 และ 4 โมลเปอร์เซ็นต์ตามลำ

ตารางที่ 3.5.ก เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA –019 โดยการใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทรายขาวและกรดโพรพิโอนิก (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร)

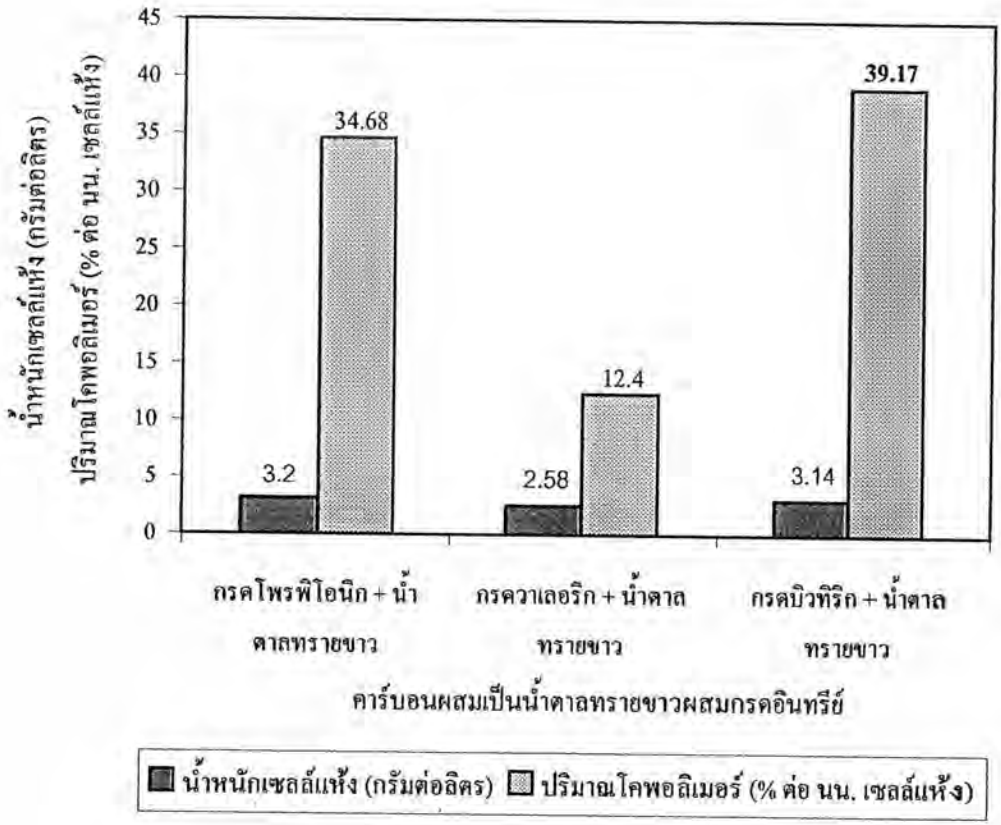
ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PH	ปริมาณ P(3HB-co-3HV)		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
กรดโพรพิโอนิก	น้ำตาลทรายขาว			% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV
1	19	2.73	5.71	29.67	0.81	86	14
2	18	3.06	5.58	30.72	0.94	78	22
3	17	3.03	5.51	32.34	0.98	72	28
4	16	**3.20**	5.54	**34.68**	**1.11**	**70**	**30**
5	15	3.12	5.57	26.60	0.83	68	32
7	13	2.87	5.74	26.48	0.76	65	35
10	10	2.63	5.79	24.71	0.65	63	37

ตารางที่ 3.5.ข เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA –019 โดยการใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทรายขาวและกรดบิวทิริก (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร)

ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	pH	ปริมาณ P(3HB-co-3HV)		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
กรดบิวทิริก	น้ำตาลทรายขาว			% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV
1	19	**3.14**	5.07	**39.17**	**1.23**	**96**	**4**
2	18	2.98	5 .41	35.23	1.05	94	6
3	17	2.83	5.53	32.16	0.91	93	7
4	16	2.79	5.43	31.89	0.89	91	9
5	15	2.71	5.46	30.99	0.84	90	10
7	13	2.66	5.67	30.07	0.80	88	12
10	10	2.61	5.72	29.50	0.77	88	12

ตารางที่ 3.5.ค เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA –019 โดยการใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทรายขาวและกรดควาเลอริก (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร

ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	pH	ปริมาณ P(3HB-co-3HV)		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
กรดควาเลอริก	น้ำตาลทรายขาว			% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV
1	19	2.43	5.37	10.29	0.25	80	20
2	18	**2.58**	5.46	**12.40**	**0.32**	**78**	**22**
3	17	2.46	5.39	10.97	0.27	75	25
4	16	2.37	5.36	9.70	0.23	73	27
5	15	2.29	5.35	7.86	0.18	71	29
7	13	2.18	5.60	6.42	0.14	69	31
10	10	2.07	5.65	5.31	0.11	68	32



รูปที่ 3.5 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุด ที่สังเคราะห์และสะสมจาก *Bacillus sp.* BA-019 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นน้ำตาลทรายขาวผสมกรดอินทรีย์

3.4.2 การศึกษาแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกลูโคสกับกรดอินทรีย์ (กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก และ กรดวาเลอริก) เพื่อการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์

เลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 เพื่อสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) (ตามวิธีการทดลองข้อ 2.5.5 และข้อ 2.8.1) โดยศึกษาเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนผสมที่ใช้ดังนี้

ก. อาหารเพื่อการผลิตที่มีกลูโคสเท่ากับ 19 18 17 16 15 13 และ 10 กรัมต่อลิตรผสมกับกรดโพรพิโอนิก 1 2 3 4 5 7 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ(ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร)

ข. อาหารเพื่อการผลิตที่มีกลูโคสเท่ากับ 19 18 17 16 15 13 และ 10 กรัมต่อลิตรผสมกับกรดบิวทิริก 1 2 3 4 5 7 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร)

ค. อาหารเพื่อการผลิตที่มีกลูโคสเท่ากับ 19 18 17 16 15 13 และ 10 กรัมต่อลิตรผสมกับกรดวาเลอริก 1 2 3 4 5 7 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร)

โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน

ตรวจหาการเติบโต ปริมาณโคพอลิเมอร์ สัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ ปริมาณแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดที่เหลือ และค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก ที่เวลา 36 ชั่วโมง ผลการทดลอง (ดังแสดงในตารางที่ 3.6 ก ข ค และรูปที่ 3.6) ได้พบว่า เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นกรดโพรพิโอนิก 3 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 17 กรัมต่อลิตร ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.49 กรัมต่อลิตร แต่ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 11.52 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารที่ประกอบด้วยกรดโพรพิโอนิก 2 กรัมต่อลิตรผสมกลูโคส 18 กรัมต่อลิตร ส่วนเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมกรดบิวทิริก 2 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 18 กรัมต่อลิตร ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.58 กรัมต่อลิตร แต่พบว่าปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 15.98 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ประกอบด้วยกรดบิวทิริก 3 กรัมต่อลิตร ผสมกับกลูโคส 17 กรัมต่อลิตร และแหล่งคาร์บอนผสมเป็นกรดวาเลอริก 2 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 18 กรัมต่อลิตร ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 2.61 กรัมต่อลิตร และปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ 8.04 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส 17 กรัมต่อลิตรและกรดบิวทิริก 3 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณกลูโคสและกรดบิวทิริกที่เหลือเท่ากับ 5.18 และ 1.39 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่าพีเอชของน้ำหมักแตกต่างจากค่าพีเอชเริ่มต้นกล่าวคือลดลงค่อนข้างมาก (พีเอช 4.46 – 5.39) พบว่าแหล่งคาร์บอนผสมที่ทำให้ *Bacillus* sp. BA-019 สังเคราะห์และสะสม P(3HB-co-3HV) ได้ปริมาณสูงสุดนั้น ได้แก่แหล่งคาร์บอนที่ประกอบด้วยกรดบิวทิริกกับกลูโคส (15.89 เปอร์เซ็นต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) รองลงมาได้แก่แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดโพรพิโอนิกกับกลูโคส และกรดวาเลอริกกับกลูโคส ตามลำดับ และพบว่าแหล่งคาร์บอนผสมที่ประกอบด้วยกรดวาเลอริกพบว่าได้สัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV สูงสุด

(22 โมลเปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือแหล่งคาร์บอนผสมที่ประกอบด้วย กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก ซึ่งได้สัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 16 และ 7 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 3.6 ก เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA –019 โดยการใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกลูโคส และกรดโพริพโอนิก (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร)

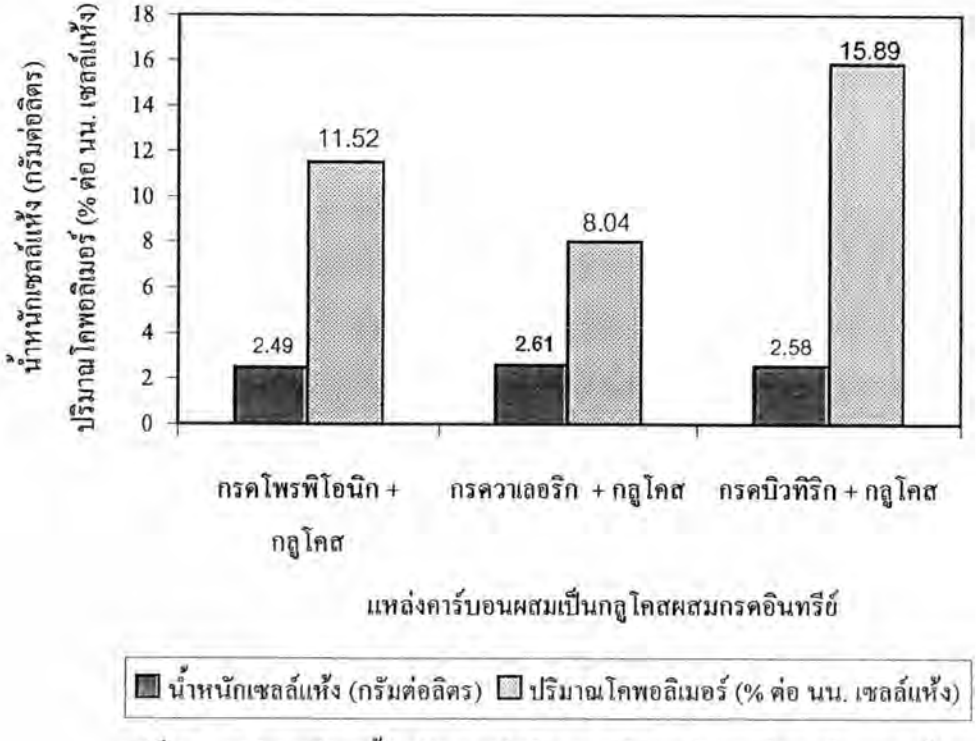
ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PH	ปริมาณ P(3HB-co-3HV)		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
กรดโพรพิโอนิก	กลูโคส			% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV
1	19	2.34	4.47	8.97	0.21	86	14
2	18	2.43	4.66	**11.52**	**0.28**	**84**	**16**
3	17	**2.49**	4.76	10.04	0.25	83	17
4	16	2.43	4.95	8.64	0.21	80	20
5	15	2.40	5.10	7.08	0.17	78	22
7	13	2.36	5.05	6.35	0.15	77	23
10	10	2.30	5.39	5.62	0.13	77	23

ตารางที่ 3.6 ข เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA –019 โดยการใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดกลูโคสและบิวทิริก (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร)

ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PH	ปริมาณ P(3HB-co-3HV)		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
กรดบิวทิริก	กลูโคส			% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV
1	19	2.54	4.47	10.23	0.26	96	4
2	18	**2.58**	4.67	11.24	0.29	95	5
3	17	2.39	4.81	**15.89**	**0.38**	**93**	**7**
4	16	2.36	4.90	13.13	0.31	92	8
5	15	2.34	4.95	11.53	0.27	91	9
7	13	2.31	5.07	10.82	0.25	91	9
10	10	2.28	5.28	9.64	0.22	91	9

ตารางที่ 3.6 ค เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA –019 โดยการใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกลูโคส และกรดวาเลอริก (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร)

ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PH	ปริมาณ P(3HB-co-3HV)		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
กรดวาเลอริก	กลูโคส			% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV
1	19	2.49	4.46	6.02	0.15	81	19
2	18	**2.61**	4.68	**8.04**	**0.21**	**78**	**22**
3	17	2.53	4.87	7.50	0.19	76	24
4	16	2.50	5.03	6.40	0.16	74	26
5	15	2.47	5.14	6.07	0.15	73	27
7	13	2.41	5.18	5.39	0.13	72	28
10	10	2.33	5.35	4.72	0.11	72	28



รูปที่ 3. 6 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุด ที่สังเคราะห์และสะสมจาก *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นกลูโคสผสมกรดอินทรีย์

3.4.3 การศึกษาแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างฟรุกโตสกับกรดอินทรีย์ (กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก และ กรดวาเลอริก) เพื่อการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์

จากผลการวิจัยของ อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) พบว่า *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการสังเคราะห์และสะสม PHB ได้ดี ในปี 2537 อัญชนา ศุรติขจร ได้ใช้ฟรุกโตสผสมกับกรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนผสม สำหรับการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ *Alcaligenes* sp.A-04 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทดลองนำฟรุกโตสมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนผสมกับชนิดกรดอินทรีย์ที่ได้คัดเลือกแล้ว เพื่อที่จะศึกษาความสามารถในการใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนผสมเพื่อการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV)

เลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 เพื่อสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ (ตามวิธีการทดลองข้อ 2.5.5 และข้อ 2.8.1) โดยศึกษาเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนผสมที่ใช้ดังนี้

ก. อาหารเพื่อการผลิตที่มีฟรุกโตส 19 18 17 16 15 13 และ 10 กรัมต่อลิตรผสมกับกรดโพรพิโอนิก 1 2 3 4 5 7 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร)

ข. อาหารเพื่อการผลิตที่มีฟรุกโตส 19 18 17 16 15 13 และ 10 กรัมต่อลิตรผสมกับกรดบิวทิริก 1 2 3 4 5 7 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร)

ค. อาหารเพื่อการผลิตที่มีฟรุกโตส 19 18 17 16 15 13 และ 10 กรัมต่อลิตรผสมกับกรดวาเลอริก 1 2 3 4 5 7 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร)

โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน

ตรวจหาการเติบโต ปริมาณโคพอลิเมอร์ สัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ ปริมาณแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดที่เหลือ และค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก ที่เวลา 36 ชั่วโมง ผลการทดลอง(ดังแสดงในตารางที่ 3. 7 ก ข และ ค และรูปที่ 2.7) พบว่าเมื่อ *Bacillus* sp. BA-19 ใช้แหล่งคาร์บอนผสมกรดโพรพิโอนิก 3 กรัมต่อลิตร และฟรุกโตส 17 กรัมต่อลิตรได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.33 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 17.19 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ประกอบด้วยกรดโพรพิโอนิก 4 กรัมต่อลิตรผสมฟรุกโตส 16 กรัมต่อลิตร ส่วนเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมกรดบิวทิริก 3 กรัมต่อลิตรและฟรุกโตส 17 กรัมต่อลิตรได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.57 กรัมต่อลิตร และปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ 27.63 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนในแหล่งคาร์บอนผสมกรดวาเลอริก 2 กรัมต่อลิตร และฟรุกโตส 18 กรัมต่อลิตรได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.18 กรัมต่อลิตร และปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ 24.31 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ได้พบว่าแหล่งคาร์บอนผสมที่ทำให้ *Bacillus* sp. BA-019 สังเคราะห์และสะสม P(3HB-co-3HV) ได้ปริมาณสูงสุดนั้นได้แก่แหล่งคาร์บอนเป็นกรดบิวทิริกกับฟรุกโตสรองลงมาได้แก่ แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดโพรพิโอนิกกับ

น้ำตาลทรายขาว และกรดวาเลอริกกับน้ำตาลทรายขาว ตามลำดับ ในอาหารที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 17 กรัมต่อลิตรและกรดบิทิริก 3 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณฟรุกโตสและกรดบิวทิริกที่เหลือเท่ากับ 4.61 และ 1.57 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และพบว่าแหล่งคาร์บอนผสมที่ประกอบด้วยกรดวาเลอริกพบว่าได้สัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV สูงสุด (22 โมลเปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือแหล่งคาร์บอนที่ประกอบด้วยกรดโพรพิโอนิกและกรดบิวทิริก ซึ่งได้สัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 16 และ 6 โมลเปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ตารางที่ 3.7 การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA –019 โดยการใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างฟรุกโตสและกรดโพรพิโอนิก (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร)

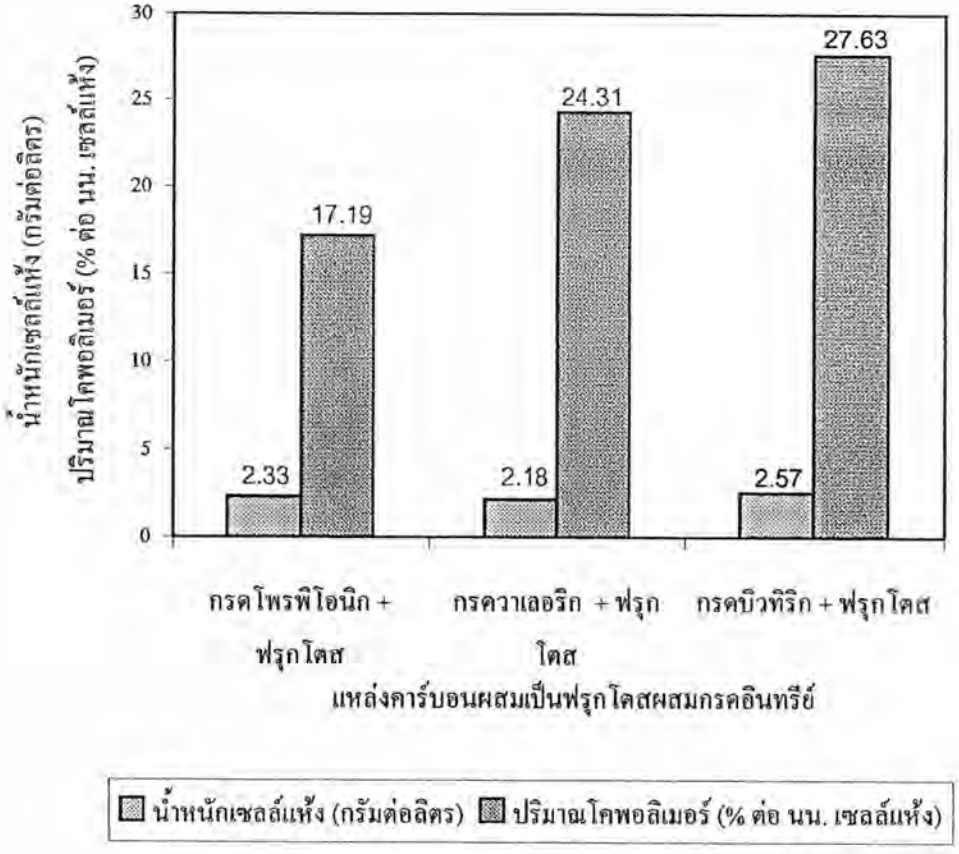
ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	pH	ปริมาณ P(3HB-co-3HV)		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
กรดโพรพิโอนิก	ฟรุกโตส			% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV
1	19	2.07	5.51	11.10	0.23	88	12
2	18	2.24	5.64	12.50	0.28	87	13
3	17	**2.33**	5.74	15.02	0.35	86	14
4	16	2.21	5.82	**17.19**	**0.38**	**84**	**16**
5	15	2.18	5.69	15.59	0.34	84	16
7	13	2.14	5.77	14.48	0.31	83	17
10	10	2.07	5.87	14.49	0.30	83	17

ตารางที่ 3.7 ข เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA –019 โดยการใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างฟรุกโตสและกรดบิวทิริก (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร)

ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	pH	ปริมาณ P(3HB-co-3HV)		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
กรดบิวทิริก	ฟรุกโตส			% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV
1	19	2.42	5.39	23.55	0.57	96	4
2	18	2.46	5.56	26.83	0.66	95	5
3	17	**2.57**	5.77	**27.63**	**0.71**	**94**	**6**
4	16	2.45	5.80	26.12	0.64	93	7
5	15	2.42	5.85	23.55	0.57	93	7
7	13	2.37	5.65	20.25	0.48	92	8
10	10	2.29	5.90	17.90	0.41	90	9

ตารางที่ 3.7 ค เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA –019 โดยการใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างฟรุกโตสและกรดวาเลอริก (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร)

ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	pH	ปริมาณ P(3HB-co-3HV)		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
กรดวาเลอริก	ฟรุกโตส			% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV
1	19	1.97	4.48	19.28	0.38	80	20
2	18	**2.18**	4.67	**24.31**	**0.53**	**78**	**22**
3	17	2.13	4.74	21.16	0.45	75	25
4	16	2.10	4.68	17.61	0.37	73	27
5	15	2.05	4.87	15.12	0.31	71	29
7	13	2.03	5.18	14.77	0.30	70	30
10	10	2.01	5.35	13.39	0.28	70	30



รูปที่ 3.7 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดที่สังเคราะห์และสะสมจาก *Bacillus* sp. BA-19 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นฟรุกโตสผสมกรดอินทรีย์ โตสผสมกรดอินทรีย์

3.4.4 การศึกษาแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทรายแดงกับกรดอินทรีย์ (กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก และ กรดวาเลอริก) เพื่อการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์

รัตนศิริ มุฑิตากุล (2538) ได้รายงานว่า *Bacillus* sp. BA-019 สามารถใช้น้ำตาลทรายแดงเป็นแหล่งคาร์บอนในการสังเคราะห์และสะสม PHB ในงานวิจัยนี้มุ่งที่จะเลือกแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกเพื่อลดต้นทุนการผลิต ซึ่งน้ำตาลทรายแดงเป็นวัตถุดิบชนิดหนึ่งที่มีราคาถูก จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC พบว่าองค์ประกอบในน้ำตาลทรายแดงมีน้ำตาลซูโครสเป็นส่วนใหญ่ ฟรุกโตส และ กลูโคส รองลงมา ตามลำดับ (แสดงข้อมูลในภาคผนวก ค)

เลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 เพื่อสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ (ตามวิธีการทดลองข้อ 2.5.5 และข้อ 2.8.1) โดยศึกษาเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนผสมที่ใช้ดังนี้

ก. อาหารเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลทรายแดง 19 18 17 16 15 13 และ 10 กรัมต่อลิตร ผสมกับกรดโพรพิโอนิก 1 2 3 4 5 7 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร)

ข. อาหารเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลทรายแดง 19 18 17 16 15 13 และ 10 กรัมต่อลิตรผสมกับกรดบิวทิริก 1 2 3 4 5 7 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ(ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร)

ค. อาหารเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลทรายแดง 19 18 17 16 15 13 และ 10 กรัมต่อลิตรผสมกับกรดวาเลอริก 1 2 3 4 5 7 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ(ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร)

โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน

ตรวจหาการเติบโต ปริมาณโคพอลิเมอร์ สัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ ปริมาณแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดที่เหลือ และค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก ที่เวลา 36 ชั่วโมง ผลการทดลอง (ดังแสดงในตารางที่ 3.8 ก ข และ ค และรูปที่ 3.8) ได้พบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นกรดโพรพิโอนิก 1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลทรายแดง 19 กรัมต่อลิตรได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.51 กรัมต่อลิตร และปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 32.76 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมที่เป็นกรดบิวทิริก 4 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลทรายแดง 16 กรัมต่อลิตรได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.71 กรัมต่อลิตรแต่ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ 38.09 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารที่ประกอบด้วยกรดบิวทิริก 1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลทรายแดง 19 กรัมต่อลิตร และแหล่งคาร์บอนผสมเป็นกรดวาเลอริก 4 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลทรายแดง 16 กรัมต่อลิตรได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.87 กรัมต่อลิตร แต่ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ 22.71 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารที่ประกอบด้วยกรดวาเลอริก 2 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลทรายแดง 18 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลทรายแดง 19 กรัมต่อลิตรและกรดบิวทิริก 1 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณน้ำตาลทรายแดงและกรดบิวทิริกที่เหลือเท่ากับ 3.29 และ 0.46 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่าพีเอชของน้ำหมักมีค่าไม่แตกต่างจากค่าพีเอช

เริ่มต้นมากนัก พบว่าแหล่งคาร์บอนผสมที่ทำให้ *Bacillus* sp. BA-019 สังเคราะห์และสะสม P(3HB-co-3HV) ได้ปริมาณสูงสุดนั้น ได้แก่แหล่งคาร์บอนที่ประกอบด้วยกรดบิวทิริกกับน้ำตาลทรายแดง (32.76 เปอร์เซ็นต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) รองลงมาได้แก่ คาร์บอนผสมระหว่างกรดโพรพิโอนิกกับน้ำตาลทรายขาว และกรดวาเลอริกกับน้ำตาลทรายขาว ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าแหล่งคาร์บอนผสมที่ประกอบด้วยกรดวาเลอริกพบว่าได้สัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV สูงสุด (22 โมลเปอร์เซ็นต์) รองลงมา คือแหล่งคาร์บอนที่ประกอบด้วย กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก ซึ่งได้สัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 16 และ 5 โมลเปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

จากการศึกษาใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอนผสมกับกรดอินทรีย์เลี้ยงเชื้อเพื่อการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) โดย *Bacillus* sp. BA-019 สามารถสรุปได้ว่าแหล่งคาร์บอนผสมที่ประกอบด้วยน้ำตาลทรายขาวกับกรดบิวทิริก ได้ปริมาณโคพอลเมอร์ เท่ากับ 39.17 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง รองลงมา คือ กรดบิวทิริกกับน้ำตาลทรายแดงเท่ากับ 38.09 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

ตารางที่ 3.8 ก เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA –019 โดยการใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทรายแดงและกรดโพรพิโอนิก (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร)

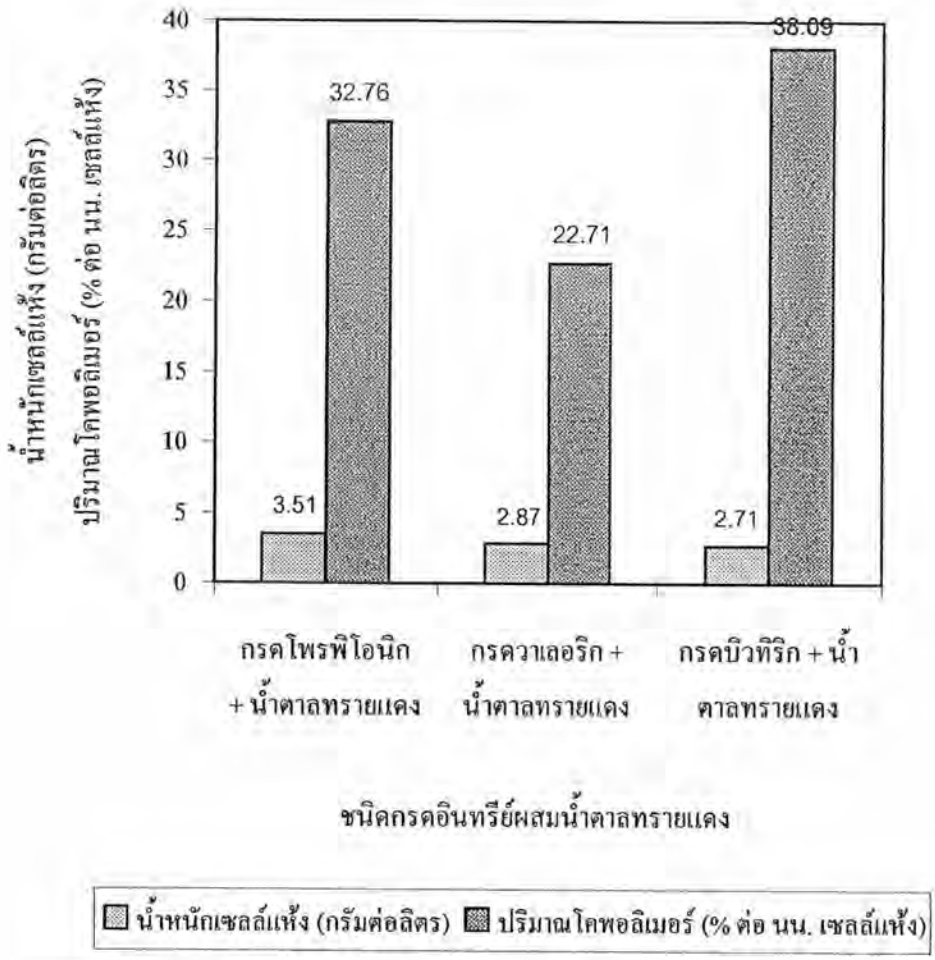
ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	pH	ปริมาณ P(3HB-co-3HV)		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
กรดโพรพิโอนิก	น้ำตาลทรายแดง			% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV
1	19	**3.51**	4.87	**32.76**	**1.15**	**84**	**16**
2	18	3.26	5.05	31.28	1.02	81	19
3	17	3.13	5.24	30.99	0.97	78	22
4	16	2.98	5.41	30.87	0.92	77	23
5	15	2.90	5.48	30.34	0.88	74	26
7	13	2.81	5.60	28.83	0.81	72	28
10	10	2.65	5.71	27.54	0.73	72	28

ตารางที่ 3.8 ข เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA –019 โดยการใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทรายแดงและกรดบิวทิริก (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร)

ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PH	ปริมาณโค P(3HB-co-3HV)		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
กรดบิวทิริก	น้ำตาลทรายแดง			% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV
1	19	2.52	4.71	**38.09**	**0.96**	**95**	**5**
2	18	2.54	5.23	25.19	0.64	95	5
3	17	2.57	5.41	21.01	0.54	93	7
4	16	**2.71**	5.50	17.71	0.48	91	9
5	15	2.63	5.60	16.34	0.43	90	10
7	13	2.58	5.57	14.34	0.37	89	11
10	10	2.46	5.74	13.41	0.33	88	12

ตารางที่ 3.8 ค เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA –019 โดยการใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทรายแดงและกรดวาเลอริก (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร)

ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PH	ปริมาณ P(3HB-co-3HV)		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
กรดวาเลอริก	น้ำตาลทรายแดง			% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HV	3HB
1	19	2.65	4.93	11.69	0.31	79	21
2	18	2.51	5.23	**22.71**	**0.57**	**78**	**22**
3	17	2.45	5.30	17.55	0.43	77	23
4	16	**2.87**	5.36	13.93	0.40	75	25
5	15	2.71	5.40	13.65	0.37	74	26
7	13	2.49	5.48	14.06	0.35	74	26
10	10	2.41	5.56	13.69	0.33	72	28



รูปที่ 3.8 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-109 ในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลทรายแดงและกรดอินทรีย์

3.4.5 การศึกษาแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดอินทรีย์ 2 ชนิด

Doi และคณะ (1988) ได้ศึกษาการใช้กรดอินทรีย์ 2 ชนิด (กรดบิวทิริกและกรดวาเลอริก) เป็นแหล่งคาร์บอนผสมสำหรับการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์โดย *Alcaligenes eutrophus* ได้สัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV ตั้งแต่ 0 - 90 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งขึ้นอยู่กับอัตราส่วนผสมระหว่างกรดอินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด

เลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 เพื่อสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ (ตามวิธีการทดลองข้อ 2.5.5และข้อ 2.8.2) จากการศึกษาผสมที่มีกรด สังเกตได้ว่าปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนที่ประกอบด้วยกรดอินทรีย์ปริมาณค่อนข้างต่ำ ดังนั้นในการศึกษาขั้นตอนนี้ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนผสมเป็นกรดอินทรีย์ 2 ชนิด จึงใช้ความเข้มข้นรวมของกรดอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เกิน 5 กรัมต่อลิตร โดยศึกษาเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนผสมที่ใช้ดังนี้

ก. อาหารเพื่อการผลิตที่มีคาร์บอนผสมของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดบิวทิริกริก ดังนี้ 4 : 1 3 :2 2 : 3 และ 1 : 4 (ปริมาณเป็นกรัมต่อลิตร)

ข. อาหารเพื่อการผลิตที่มีคาร์บอนผสมของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดวาเลอริกริก ดังนี้ 4 : 1 3 :2 2 : 3 และ 1 : 4 (ปริมาณเป็นกรัมต่อลิตร)

ค. อาหารเพื่อการผลิตที่มีคาร์บอนผสมของกรดวาเลอริกต่อบิวทิริก ดังนี้ 4 : 1 3 :2 2 : 3 และ 1 : 4 (ปริมาณเป็นกรัมต่อลิตร)

โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน

ตรวจหาการเติบโต ปริมาณโคพอลิเมอร์ สัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ ปริมาณแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดที่เหลือ และค่าความเป็นกรด- ด่างของน้ำหมัก ที่เวลา 36 ชั่วโมง ผลการทดลอง (ดังแสดงในตารางที่ 3.9 ก ข และ ค และรูปที่ 3.9) ได้พบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมที่ประกอบด้วยกรดวาเลอริกกับกรดบิวทิริกที่อัตราส่วนเท่ากับ 1 : 4 ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 29.30 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง รองลงมาคือคู่กรดโพรพิโอนิกกับกรดวาเลอริก และคู่กรดโพรพิโอนิกกับบิวทิริก ซึ่งได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ใกล้เคียงกันเท่ากับ 24.82 และ 23.79 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมที่เป็นกรดอินทรีย์พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคพอลิเมอร์(เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และกรัมต่อลิตร) น้อยกว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกับกรดอินทรีย์ ส่วนสัดส่วนของโมโนเมอร์3HV เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแหล่งคาร์บอนผสมที่ทำให้ *Bacillus* sp. BA-019 สร้างและสะสม P(3HB-co-3HV) ได้ปริมาณสูงสุดนั้น พบว่าแหล่งคาร์บอนผสมเป็นกรดโพรพิโอนิกกับกรดวาเลอริกได้โมลเปอร์เซ็นต์ 3HV (เท่ากับ26 โมลเปอร์เซ็นต์) สูงกว่าคู่กรดผสมคู่อื่น ๆ

ตารางที่ 3.9 ก เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA –019 โดยการใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดโพรพิโอนิกและกรดบิวทิริก (ปริมาณรวมเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร)

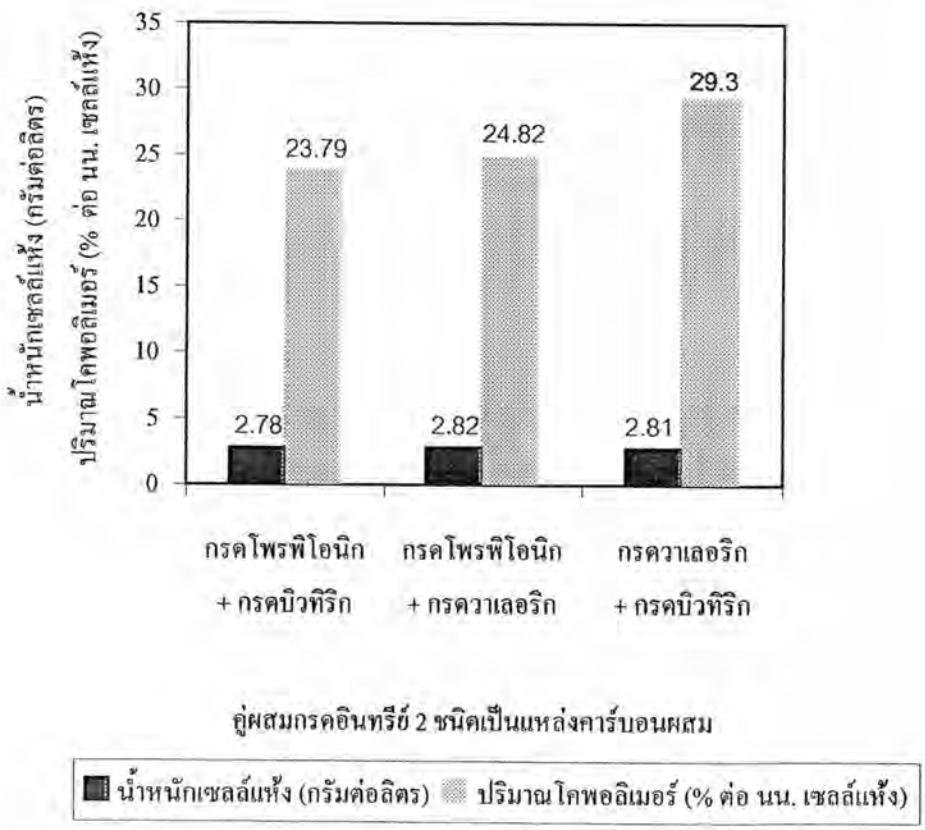
ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	pH	ปริมาณ P(3HB-co-3HV)		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
กรดโพรพิโอนิก	กรดบิวทิริก			% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV
1	4	2.69	5.98	**23.79**	**0.64**	**96**	**6**
2	3	**2.78**	5.99	20.86	0.58	95	5
3	2	2.66	5.90	19.17	0.51	94	6
4	1	2.79	5.89	16.84	0.47	94	6

ตารางที่ 3.9 ข เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA –019 โดยการใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดโพรพิโอนิกและกรดวาเลอริก (ปริมาณรวมเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร)

ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	pH	ปริมาณ P(3HB-co-3HV)		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
กรดโพรพิโอนิก	กรดวาเลอริก			% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV
1	4	2.70	5.98	17.40	0.47	83	17
2	3	2.74	5.92	19.78	0.54	80	20
3	2	**2.82**	5.98	**24.82**	**0.70**	**74**	**26**
4	1	2.35	5.96	18.29	0.43	70	30

ตารางที่ 3.9 ค เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA –019 โดยการใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดวาเลอริกและกรดบิวทิริก (ปริมาณรวมเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร)

ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	pH	ปริมาณ P(3HB-co-3HV)		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
กรดวาเลอริก	กรดบิวทิริก			% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV
1	4	**2.81**	6.17	21.71	0.61	85	15
2	3	2.73	6.07	**29.30**	**0.80**	**81**	**19**
3	2	2.67	6.08	20.97	0.56	79	21
4	1	2.68	5.92	17.53	0.47	75	25



รูปที่ 3. 9 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ได้สูงสุดที่สังเคราะห์และสะสมจาก *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นกรดอินทรีย์สองชนิด

3.4.6 การศึกษาแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกากน้ำตาลกับกรดอินทรีย์ (กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก และ กรดวาเลอริก)

จากการรายงานของ รัตนศิริ มุฑิตากุล (2538) พบว่า *Bacillus* sp. BA- 019 สามารถใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีสำหรับการสังเคราะห์และสะสม PHB ซึ่งกากน้ำตาลมีความเหมาะสมในการนำไปใช้เป็นสารอาหารเพื่อการผลิตระดับส่วนขยาย เนื่องจากมีราคาถูก และหาได้ง่ายภายในประเทศ ดังนั้นจึงนำกากน้ำตาลมาเป็นแหล่งคาร์บอนผสมกับกรดอินทรีย์เพื่อการสร้างและสะสมโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV)

เลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 เพื่อสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ (ตามวิธีการทดลองข้อ 2.5.5และข้อ 2.8.1) โดยศึกษาเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนผสมที่ใช้ดังนี้

ก. อาหารเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 19.9 19.5 19 18 17 16 15 13 10 7 และ 4 กรัมต่อลิตรผสมกับกรดโพรพิโอนิก 0.1 0.5 1 2 3 4 5 7 10 13 และ 16 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ข. อาหารเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 19.9 19.5 19 18 17 16 15 13 10 7 และ 4 กรัมต่อลิตรผสมกับกรดบิวทิริก 0.1 0.5 1 2 3 4 5 7 10 13 และ 16 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ค. อาหารเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลในกากน้ำตาลเท่ากับ 19.9 19.5 19 18 17 16 15 13 10 7 และ 4 กรัมต่อลิตรผสมกับกรดวาเลอริก 0.1 0.5 1 2 3 4 5 7 10 13 และ 16 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน

ตรวจหาการเติบโต ปริมาณโคพอลิเมอร์ สัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ ปริมาณแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดที่เหลือ และค่าความเป็นกรด- ด่างของน้ำหมัก ที่เวลา 36 ชั่วโมง ผลการทดลอง (ดังแสดงในตารางที่ 3.10 ก ข และค และรูปที่ 3.9) ได้พบว่าเมื่อ *Bacillus* sp. BA-019 ใช้แหล่งคาร์บอนผสมกรดเป็นโพรพิโอนิก 0.5 กรัมต่อลิตร และกากน้ำตาล 19.5 กรัมต่อลิตรได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.67 กรัมต่อลิตร และปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 53.43 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นกรดบิวทิริก 1 กรัมต่อลิตร และกากน้ำตาล 19 กรัมต่อลิตรได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.23 กรัมต่อลิตรแต่ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์เปอร์เซ็นต์สูงสุดเท่ากับ 51.10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารที่ประกอบด้วยกรดโพรพิโอนิก 2 กรัมต่อลิตรผสมกับกากน้ำตาล 18 กรัมต่อลิตร และแหล่งคาร์บอนผสมเป็นกรดวาเลอริก 0.5 กรัมต่อลิตร กับกากน้ำตาล 19.5 กรัมต่อลิตรได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.18 กรัมต่อลิตรแต่ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 29.19 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อใช้อาหารที่ประกอบด้วยกรดวาเลอริก 1 กรัมผสมกับกากน้ำตาล 19 กรัมต่อลิตร

ในอาหารที่ประกอบด้วยกากน้ำตาล 19.5 กรัมต่อลิตรและกรดโพรพิโอนิก 0.5 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณกากน้ำตาลที่เหลือเท่ากับ 2.20 และ กรดโพรพิโอนิกถูกใช้หมด ค่าพีเอชของน้ำหมักไม่เปลี่ยนแปลงจากค่าพีเอชเริ่มต้นมากนัก พบว่าแหล่งคาร์บอนผสมที่ทำให้ *Bacillus* sp. BA-019 สังเคราะห์และสะสม P(3HB-co-3HV) ได้ปริมาณสูงสุดนั้น ได้แก่ แหล่งคาร์บอนที่ประกอบด้วยกรดโพรพโอนิกกับกากน้ำตาล (53.43 เปอร์เซ็นต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) รองลงมาได้แก่คาร์บอนผสมระหว่างกรดบิวทิริกกับกากน้ำตาล และกรดวาเลอริกกับกากน้ำตาล ตามลำดับ และได้พบว่าแหล่งคาร์บอนผสมประกอบด้วยกรดอินทรีย์ ซึ่งเป็นกรดวาเลอริกพบว่าโคพอลิเมอร์ที่ได้ประกอบด้วยสัดส่วนโมโนเมอร์ของ3HV สูงสุด รองลงมาสัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HVจากแหล่งคาร์บอนที่มีกรดอินทรีย์เป็นกรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก ตามลำดับ

จากผลการทดลองข้อ 3.2 ถึง 3.9 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในแหล่งคาร์บอนผสมที่ประกอบด้วยน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลกับกรดอินทรีย์ พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์สูงกว่าเมื่อใช้น้ำตาลชนิดอื่น ๆ เช่น น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง กลูโคส ซูโครส และฟรุกโตส ผสมกับกรดอินทรีย์ โดยที่สัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV ใกล้เคียงกัน ในขั้นตอนนี้จึงเลือกคาร์บอนผสมเป็นกากน้ำตาลซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรวมเท่ากับ 19.5 กรัมต่อลิตร และกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3.10 ก เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA –019 โดยการใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นกากน้ำตาลกับกรดโพรพิโอนิก

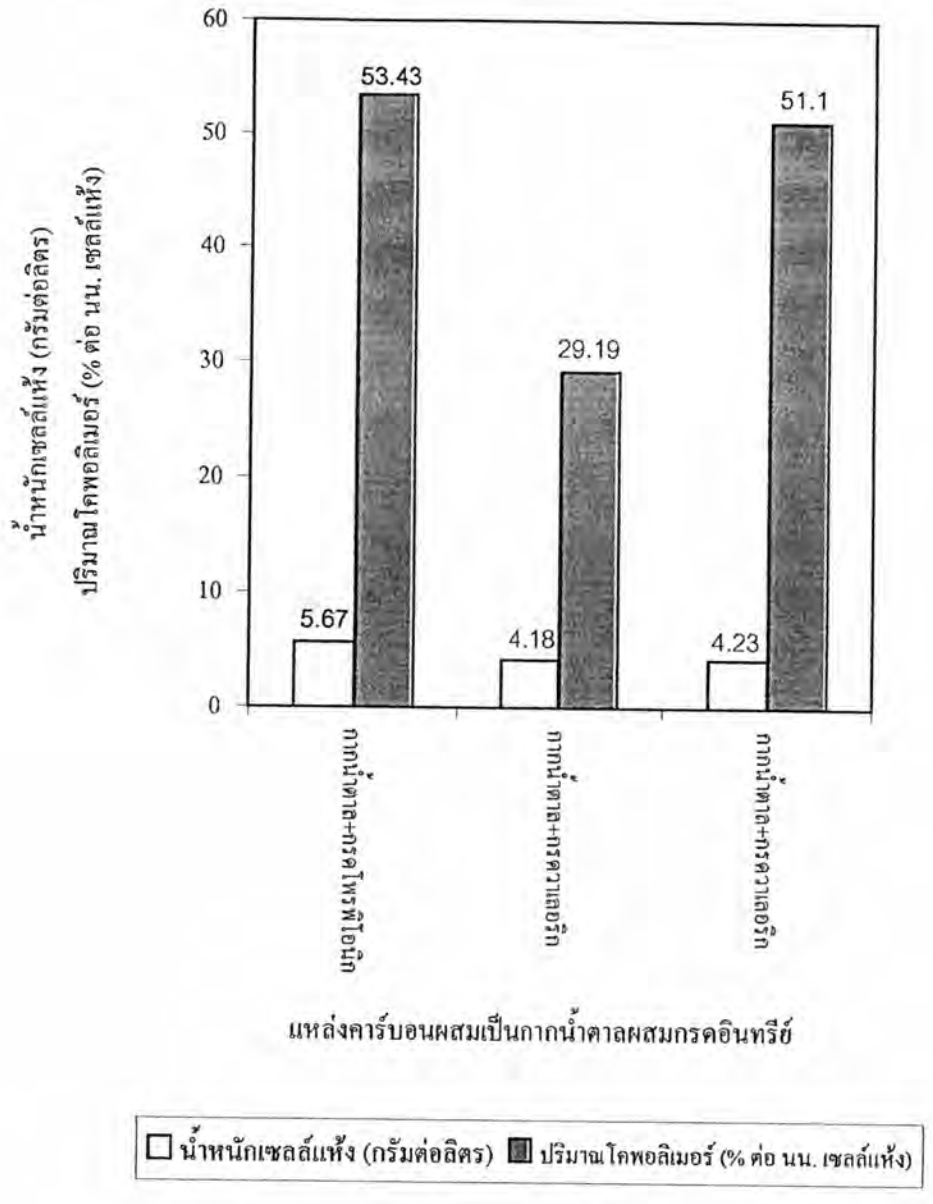
ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PH	ปริมาณ P(3HB-co-3HV)		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
กรดโพรพิโอนิก	น้ำตาลรวมในกากน้ำตาล			% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV
0.1	19.9	5.54	4.94	44.94	2.49	95	5
0.5	19.5	**5.67**	5.05	**53.43**	**3.03**	**93**	**7**
1.0	19.0	5.48	5.13	52.55	2.88	89	11
2.0	18.0	5.26	4.81	52.09	2.74	87	13
3.0	17.0	5.16	4.82	51.55	2.66	85	15
4.0	16.0	4.98	4.91	51.60	2.57	83	17
5.0	15.0	4.85	5.04	48.45	2.35	83	17
7.0	13.0	4.76	5.14	47.68	2.27	81	19
10.0	10.0	4.68	5.26	44.37	2.13	79	21
13.0	7.0	4.54	5.46	44.93	2.04	75	25
16.0	4.0	4.49	5.59	42.53	1.91	75	25

ตารางที่ 3.10 ข เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA -019 โดยการใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นในกากน้ำตาลกับกรดบิวทิริก

ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PH	ปริมาณ P(3HB-co-3HV)		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
กรดบิวทิริก	น้ำตาลรวมในกากน้ำตาล			% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV
0.1	19.9	3.96	4.96	44.94	1.78	96	4
0.5	19.5	4.13	4.82	43.58	1.80	95	5
1.0	19.0	**4.23**	4.67	46.09	1.95	94	6
2.0	18.0	4.07	4.77	**51.10**	**2.08**	91	**9**
3.0	17.0	3.91	4.85	50.63	1.98	90	10
4.0	16.0	3.84	4.97	50.23	1.93	89	11
5.0	15.0	3.71	5.08	49.59	1.84	89	11
7.0	13.0	3.62	5.22	48.34	1.75	88	12
10.0	10.0	3.54	5.30	47.17	1.67	88	12
13.0	7.0	3.49	5.42	45.55	1.59	87	13
16.0	4.0	3.27	5.67	47.09	1.54	87	13

ตารางที่ 3.10 ค เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA -019 โดยการใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นกากน้ำตาลกับกรดวาเลอริก

ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	pH	ปริมาณ P(3HB-co-3HV)		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
กรดวาเลอริก	น้ำตาลรวมในกากน้ำตาล			% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV
0.1	19.9	3.75	4.91	21.60	0.81	89	11
0.5	19.5	**4.18**	5.58	23.44	0.98	87	13
1.0	19.0	3.87	5.57	**29.19**	**1.13**	**85**	**15**
2.0	18.0	3.61	5.75	27.70	1.02	84	16
3.0	17.0	3.52	4.88	25.85	0.91	81	19
4.0	16.0	3.47	4.93	25.07	0.87	80	20
5.0	15.0	3.21	5.03	22.74	0.73	79	21
7.0	13.0	3.15	5.19	16.23	0.56	78	22
10.0	10.0	3.03	5.39	16.50	0.50	78	22
13.0	7.0	2.91	5.65	16.15	0.47	76	24
16.0	4.0	2.85	5.72	14.03	0.40	75	24



รูปที่ 3.10 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดที่สังเคราะห์และสะสมจาก*Bacillus* sp.BA-019เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นกากน้ำตาลและกรดอินทรีย์น้ำตาลและกรดอินทรีย์

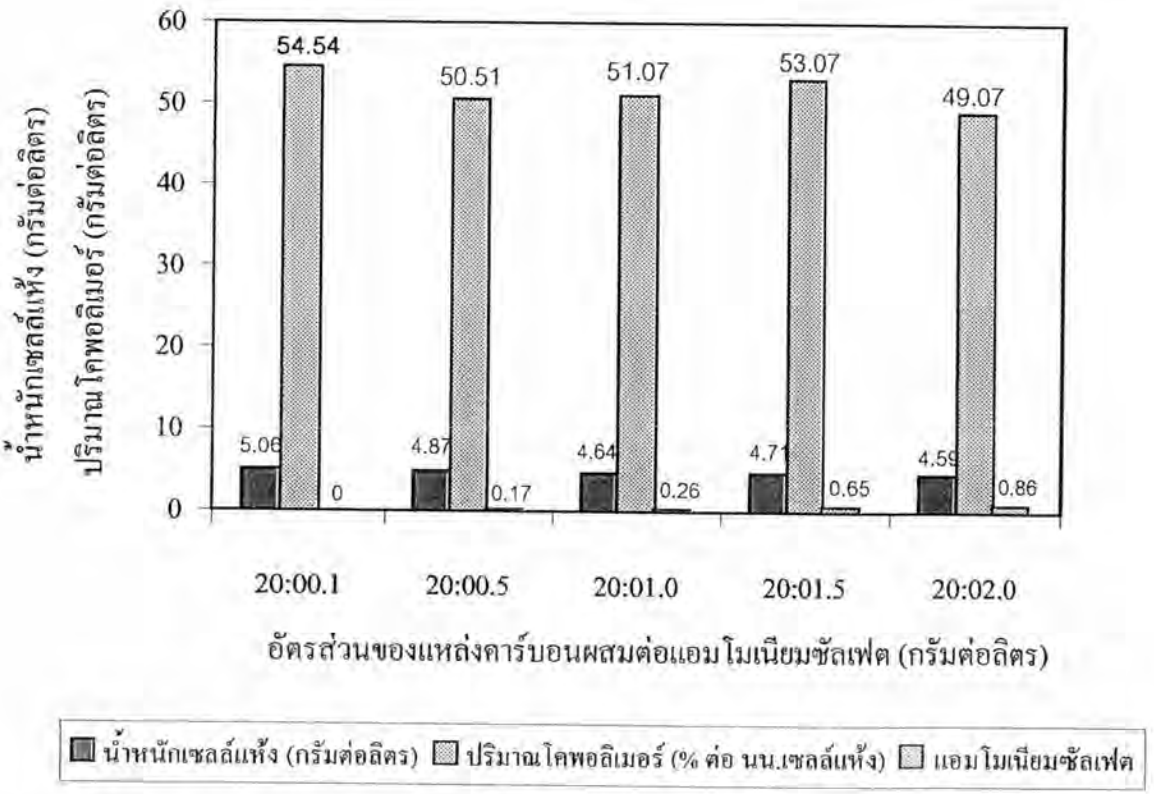
3.5 การศึกษาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนสำหรับการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์

Suzuki และคณะ (1986) ได้ศึกษาชนิดของเกลือแอมโมเนียม 6 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต โซเดียมแอมโมเนียมไมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต-เตตระไฮเดรทออกไซด์ แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต และไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการผลิต PHB โดย *Pseudomonas* sp. K-1 ในระดับขวดเขย่า พบว่าชนิดของเกลือแอมโมเนียมไม่มีผลต่อการสังเคราะห์และสะสม PHB ในปี 1992 Daniel และคณะ ได้รายงานผลการจำกัดปริมาณไนโตรเจนต่อการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Pseudomonas* sp. 135 ที่เลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นจาก 34 เป็น 55 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยที่ชนิดของเกลือแอมโมเนียมในรูปแอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต และ แอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) ได้รายงานว่าการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes* sp. A-04 ในระดับขวดเขย่า พบว่าเมื่อจำกัดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB โดยได้ปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 39.98 เป็น 46.98 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และชนัญ ผลประไพ (2537) ศึกษาระดับถังหมักในเรื่องเดียวกัน พบว่าเมื่อจำกัดแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1.5 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นเป็น 82.12 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในปีเดียวกัน อัญชนา ศุรติขจร รายงานว่าการจำกัดแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB-co-3HV) โดย *Alcaligenes* sp. A-04 Beaulieu และคณะ (1995) ได้ศึกษาผลของเกลือแอมโมเนียมในรูปต่าง ๆ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมเนียมไนเตรต และแอมโมเนียมฟอสเฟต ที่มีต่อการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes eutrophus* เมื่อใช้กากน้ำตาล 0.3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.5 – 1.5 กรัมต่อลิตรมีความเหมาะสมต่อการผลิต PHB รัตนศิริ มุฑิตากุล (2539) ได้ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนพบว่าเกลือแอมโมเนียมชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมไนเตรท มีผลต่อการเติบโต การสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Bacillus* sp. BA – 019 ได้ปริมาณใกล้เคียงกัน จากนั้นได้ศึกษาปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตจำกัดที่เหมาะสมต่อการสร้างและสะสม PHB ได้พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสม ในงานวิจัยนี้ใช้ *Bacillus* sp. BA – 019 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน เพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) ดังนั้นงานวิจัยนี้เลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยศึกษาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตจำกัดที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB-co-3HV) โดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นกากน้ำตาล

และกรดโพรพิโอนิก โดยแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 – 0.2 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อเป็นเวลานาน 36 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์การเติบโต ปริมาณโคพอลิเมอร์ สัดส่วนโมโนเมอร์ ปริมาณแหล่งคาร์บอนและปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตจำกัดที่เหมาะสมเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร โดย *Bacillus* sp. BA-019 สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB-co-3HV) เท่ากับ 53.43 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.06 กรัมต่อลิตรและพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตถูกใช้หมด และปริมาณกากน้ำตาล และ กรดโพรพิโอนิกที่เหลือเท่ากับ 2.38 และกรดโพรพิโอนิกถูกใช้หมด ส่วนเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 0.5 ถึง 2.0 กรัมต่อลิตรพบว่ายังมีแอมโมเนียมซัลเฟต ดังแสดงในตารางที่ 3.11 และรูปที่ 3. 10 ปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลและกรดโพรพิโอนิกของแหล่งคาร์บอนผสมต่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 20:0.1 ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 54.40 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารที่ประกอบด้วยกากน้ำตาล 19.5 กรัมต่อลิตร กับกรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนผสม และพบว่าอัตราส่วนของ C/N เท่ากับ 300 mol/mol ได้ปริมาณ P(3HB-co-3HV)สูงสุดเท่ากับ 50.38 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และได้สัดส่วน 3HV เท่ากับ 16 โมลเปอร์เซ็นต์ ส่วนเมื่ออัตราส่วนของ C/N เท่ากับ 375 mol/mol ได้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 7.09 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3.12

ตารางที่ 3.11 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ สัดส่วนของโมโนเมอร์ และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA –019 โดยการใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกากน้ำตาล 19.5 กรัมต่อลิตร และกรดโพรพิโอนิก 0.5 กรัมต่อลิตร และแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต

คาร์บอนผสมต่อแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PH	ปริมาณ P(3HB-co-3HV)		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
				% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV
20 : 0.1	0.00	**5.06**	4.82	**54.54**	**2.76**	**84**	**16**
20 : 0.5	0.17	4.87	4.78	50.51	2.46	84	16
20 : 1.0	0.26	4.64	4.76	51.07	2.37	84	16
20 : 1.5	1.08	4.71	4.67	53.07	2.50	84	16
20 : 2.0	1.46	4.59	4.84	49.67	2.28	84	16



รูปที่ 3.11 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-19 ในอาหารประกอบด้วยกากน้ำตาลและกรดโพรพิโอนิก โดยแปรผันปริมาณไนโตรเจน

ตารางที่ 3.12 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA –019 โดยแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน ; C/N (mol/mol) เท่ากับ 75 150 225 300 และ 375 โดยที่มีคาร์บอนผสมเป็นกากน้ำตาลและกรดโพรพิโอนิก แหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 0. 1 กรัมต่อลิตร

ปริมาณ คาร์บอนผสม (กรัมต่อลิตร)		C/N (mol/mol)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PH	ปริมาณโคพอลิเมอร์		สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)	
กากน้ำตาล	กรดโพรพิโอนิก				% ต่อ นน. เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV
24.5	0.5	375	7.09	4.89	41.48	2.97	85	15
24.0	1.0	375	5.37	5.12	24.58	1.32	76	24
19.5	0.5	300	6.75	4.98	**50.38**	3.40	**84**	**16**
19.0	1.0	300	5.14	5.09	32.98	1.37	77	23
14.5	0.5	225	5.65	4.87	43.37	2.41	85	15
14.0	1.0	225	3.80	2.15	37.45	1.42	77	23
9.5	0.5	150	4.83	5.07	37.21	1.80	85	15
9.0	1.0	150	3.61	5.13	34.30	1.24	76	24
4.5	0.5	75	3.64	4.97	31.42	1.14	84	16
4.0	1.0	75	3.56	5.01	21.56	0.77	76	24

3.6 การศึกษาสมบัติทางกายภาพบางประการของโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV)บางชนิด ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp.BA-019

อุณหภูมิหลอมเหลว(Tm) และอุณหภูมิกลาสทรานซิชั่น(Tg)ของโคพอลิเมอร์มีความสำคัญอย่างมากในการนำพอลิเมอร์ไปใช้งานรวมทั้งวิธีการขึ้นรูป พอลิเมอร์จะมีอุณหภูมิกลาสทรานซิชั่นต่ำกว่าอุณหภูมิหลอมเหลวเสมอ เมื่อพอลิเมอร์อยู่ในที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิกลาสทรานซิชั่น พอลิเมอร์มีสมบัติแข็งและเปราะคล้ายแก้ว แต่เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิกลาสทรานซิชั่น พอลิเมอร์มีลักษณะเปลี่ยนไปคือยืดหยุ่นคล้ายยาง จนกระทั่งได้รับความร้อนสูงกว่าอุณหภูมิหลอมเหลวจึงเปลี่ยนสถานะเป็นของเหลว ดังนั้นโคพอลิเมอร์ที่มีอุณหภูมิกลาสทรานซิชั่นต่ำกว่าอุณหภูมิห้องจึงมีลักษณะอ่อนนิ่ม และยืดหยุ่นคล้ายยาง โดยพอลิเมอร์มีสมบัติเป็นยางเมื่อมีอุณหภูมิกลาสทรานซิชั่นในช่วง -50 ถึง -75 °ซ เมื่อนำโคพอลิเมอร์ไปวิเคราะห์หาค่าอุณหภูมิการหลอมเหลว และอุณหภูมิกลาสทรานซิชั่น ตามวิธีการทดลองในข้อ 16.2 ได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 3.13 พบว่าเมื่อโคพอลิเมอร์มีสัดส่วนของ 3HV เพิ่มขึ้นค่าอุณหภูมิหลอมเหลวและค่าอุณหภูมิกลาสทรานซิชั่นลดลงตามลำดับ Doi (1990) รายงานว่าพอลิเมอร์จะมีอุณหภูมิหลอมเหลวต่ำสุดเท่ากับ 75 °ซ เมื่อมีสัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV เท่ากับ 40 โมลเปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.13 ค่าอุณหภูมิการเหลอมเหลว อุณหภูมิกลาสทรานซิชั่น ของโคพอลิเมอร์P(3HB-co-3HV) บางชนิดที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019 ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์แตกต่างกัน

โคพอลิเมอร์	อุณหภูมิหลอมเหลว (°ซ)	อุณหภูมิกลาสทรานซิชั่น (°ซ)
P(3HB-co-7%3HV)	168	6
P(3HB-co-13%3HV)	154	4
P(3HB-co-21%3HV)	143	-3

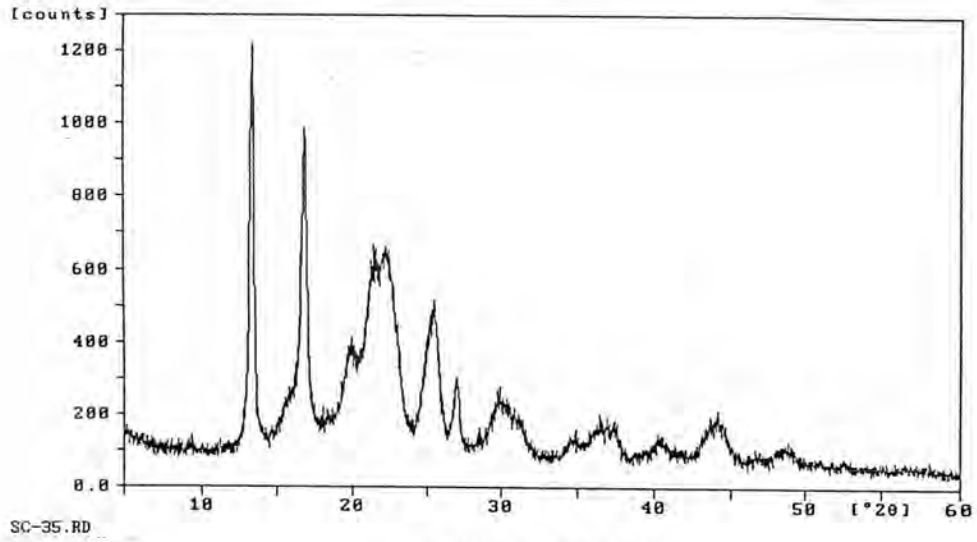
รูปที่ 3.12 ลักษณะแผ่นฟิล์มโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-13%3HV) ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp.BA-019

ได้ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยและค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลของโคพอลิเมอร์ P (3HB-co-3HV) บางชนิดที่ผลิตโดย *Bacillus* sp.BA-019 จากการวิเคราะห์หาค่า M_n M_w และ PDI ด้วยเครื่อง GPC (ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.16.1) ดังแสดงในตารางที่ 3.14 พบว่า *Bacillus* sp.BA-019 สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ได้น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยสูงสุดใกล้เคียงกัน ได้แก่ P(3HB-co- 13%3HV) ซึ่งได้ค่า $M_w = 4.63\times 10^6$ และ $M_n = 3.13\times 10^6$ และมีค่า PDI = 1.48 และโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-21%3HV) ซึ่งมีค่า $M_w = 4.42\times 10^6$ และ $M_n = 3.16\times 10^6$ โดยมีค่า PDI = 1.39

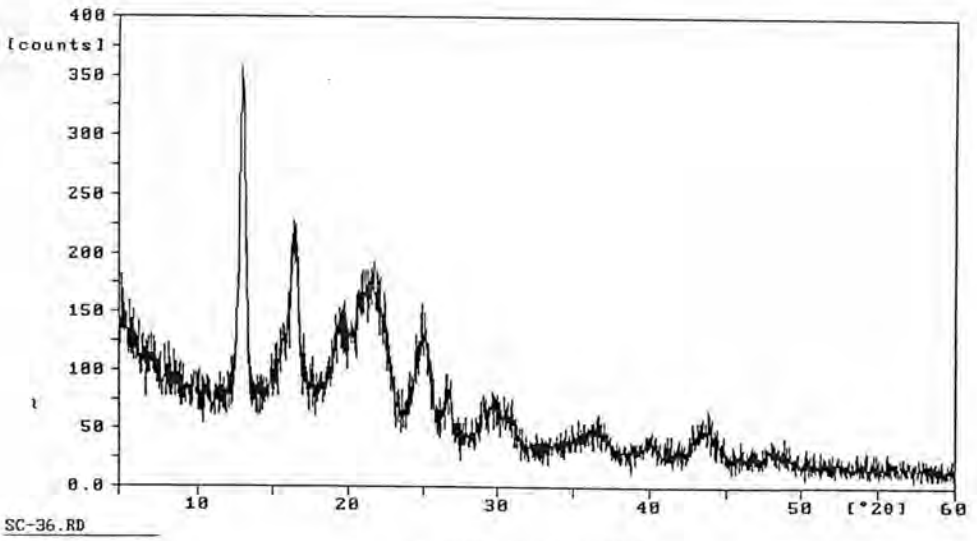
ตารางที่ 3.14 น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน และค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลของโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) บางชนิดที่ผลิตโดย *Bacillus* sp.BA-019

โคพอลิเมอร์	น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย		PDI
	M_W	M_N	
P(3HB-co-7%3HV)	2.98×10^5	1.17×10^5	2.54
P(3HB-co-13%3HV)	4.63×10^6	3.13×10^6	1.48
P(3HB-co-21%3HV)	4.42×10^6	3.16×10^6	1.39

การศึกษาเปรียบเทียบระดับความเป็นผลึกของโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) บางชนิดที่ผลิตโดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อนำแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ ไปศึกษาเปรียบเทียบระดับความเป็นผลึกโดยวิธี XRD ตามวิธีการทดลองในข้อ 16.3 ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 3.13 พบว่าโคพอลิเมอร์ (P3HB-co-7%3HV) มีความเป็นผลึกมากว่าโคพอลิเมอร์ชนิดอื่นๆ

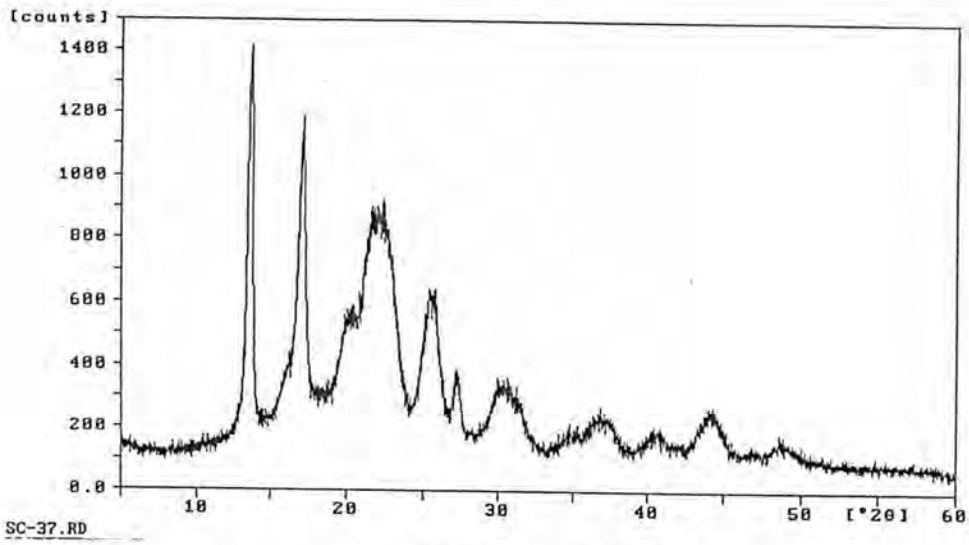


P (3HB-co-7%3HV)



P (3HB-co-13%3HV)

รูปที่ 3.13 เปรียบเทียบโครมาโตแกรมแสดงระดับความเป็นผลึกของโคพอลิเมอร์เมอร์ P(3HB-co-3HV) ซึ่งผลิตโดย *Bacillus* sp.BA-019 ที่มีสัดส่วนโมโนเมอร์แตกต่างกัน จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี XRD



P (3HB-co-21%3HV)

รูปที่ 3.13 (ต่อ) เปรียบเทียบโครมาโตแกรมแสดงระดับความเป็นผลึกของโคพอลิเมอร์เมอร์ P(3HB-co-3HV) ซึ่งผลิตโดย *Bacillus* sp.BA-019 ที่มีสัดส่วนโมโนเมอร์แตกต่างกัน จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี XRD