บทที่ 4

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีต่อการเติบโตของ *Bacillus* sp. BA-019 และการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) โดย *Bacillus* sp.BA-019 ทั้งในด้านปริมาณของพอลิเมอร์ที่ได้ ชนิดและสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในโคพอลิเมอร์ ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญ คือ ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนรวมทั้งแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งศึกษาสมบัติบางประการของโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้บางชนิด โดยมุ่งเลือกใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกตามความเหมาะสม ซึ่งในการผลิต PHA ราคาต้นทุนการผลิตที่สำคัญส่วนหนึ่งขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการวิจัยต่อไป

4.1 การเตรียมกล้าเชื้อเพื่อให้ได้เซลล์ปริมาณมากและเหมาะสมในการผลิตP(3HB-co-3HV)

จากที่ได้กล่าวไว้แล้วในตอนต้นว่า การผลิตโคพอลิเมอร์จำเป็นต้องมีกรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการสร้าง 3HV ซึ่งพบว่า *Bacillus* sp. BA-019 มีการเติบโตน้อยหรือเกือบไม่มีเลยในขั้นตอนการผลิตโคพอลิเมอร์ ดังนั้นจึงศึกษาวิธีเตรียมกล้าเชื้อเพื่อให้ได้เซลล์ปริมาณมากพอสำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์ ผลการวิจัยสรุปได้ว่าเมื่อใช้ฟรุกโตสลงเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อพบว่า *Bacillus* sp. BA-019 มีการเติบโตได้มากขึ้น โดยปริมาณฟรุกโตสที่เหมาะสมเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ อัญชนา ศุรติขจร (2537) ที่ได้ใช้อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่เติมฟรุกโตส 10 กรัมต่อลิตร เพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์P(3HB-co-3HV) โดย *Alcaligenes* sp.A-04 และ พบว่า *Alcaligenes* sp.A-04 มีการเติบโตพิ่มขึ้น ในปี 1995 Koyama และ Doi ได้ศึกษาการผลิตพอลิเมอร์P(3HB-co-3HV) โดย *Alcaligenes eutrophus* ในถังหมักระบบการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง ซึ่งได้เตรียมอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่เติมฟรุกโตส 10 กรัมต่อลิตรเช่นกัน Page และคณะ (1997) ได้ใช้อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่เติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตรเพื่อเพิ่มการสังเคราะห์และสะสม P(3HB-co-3HV) โดย *Azotobacter salinestris*

4.2 การศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์และสะสม P(3HB-co-3HV)

ในกระบวนการผลิตโคพอลิเมอร์โดย *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งได้ทำการเลี้ยงเชื้อแบบ 2 ขั้นตอน โดยขั้นแรกเป็นการเลี้ยงกล้าเชื้อในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่ได้เติมฟรุกโตส 10 กรัมต่อลิตร เพื่อให้ได้เซลล์ในปริมาณที่มากพอ จากนั้นจึงย้ายเซลล์มาเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ ซึ่งในขั้นตอนแรกนั้นนอกจากต้องให้ได้เซลล์ในปริมาณมากแล้วเซลล์ที่ได้ต้องมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ ซึ่งช่วงการเติบโตของเซลล์ที่เป็นกล้าเชื้อควรที่จะอยู่ในระยะที่มีแอคติวีตีสูง ในงานวิจัยนี้ได้เลือกกล้าเชื้ออายุ 18 24 30 และ 36 ชั่วโมง มาศึกษาเพื่อคัดเลือกอายุกล้าที่เหมาะสมในการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ ซึ่งพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ได้จากอายุกล้าเชื้อ 30 และ 24 ชั่วโมงมีค่าแตกต่างกันไม่มากนัก เพื่อลดระยะเวลาสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อและเนื่องจากเซลล์อายุ 24 ชั่วโมง เป็นเซลล์ที่มีอยู่ในระยะ mid log phase ซึ่งมีแอคติวีตีสูงกว่า ดังนั้นจึงเลือกกล้าเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง กล้าเชื้ออายุ 18 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ที่น้อยกว่า ส่วนกล้าเชื้ออายุ 36 ชั่วโมง แม้ว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดแต่ปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ได้น้อยกว่าเมื่อใช้กล้าเชื้ออายุ 24 และ 30 ชั่วโมง รวมทั้งเซลล์อยู่ในช่วงเริ่มต้น stationary phase ซึ่งอัตราการเติบโตเริ่มลดลง สำหรับการสร้างและสะสม P(3HB-co-3HV) โดย *Alcaligenes* sp. A-04 ได้ใช้กล้าเชื้ออายุ 16 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในระยะ mid log phase เช่นกัน (อัญชนา ศุรติขจร, 2537) Doi และคณะ (1988) ได้เลือกกล้าเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง เป็นอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) โดย *Alcaligenes eutrophus* ในปี1991 Chen และคณะ ได้ศึกษาการผลิต PHA โดย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งได้เลือกกล้าเชื้ออายุ 30 ชั่วโมง สำหรับการผลิต PHA

4.3 การหาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมะสมสำหรับการสังเคราะห์และสะสม P(3HV-co-3HB)

จากผลการวิจัยพบว่าในขั้นตอนการผลิตเมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมเท่ากับ 0.18 กรัม(น้ำหนักเซลล์แห้ง) ต่อปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นเท่ากับ 3.23 กรัมต่อลิตร และปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ 18.07 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เนื่องจากโคพอลิเมอร์เป็นสารผลิตภัณฑ์ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ การเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้สารผลิตภัณฑ์มาก จึงต้องคำนึงถึงปริมาณของสารผลิตภัณฑ์ทั้งในด้านสังเคราะห์โคพอลิเมอร์(เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) และปริมาณของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ (น้ำหนักเซลล์แห้งต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) จากงานวิจัยของ อัญชนา ศุรติขจร (2537) เลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 เพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ โดยใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม 0.6 กรัม(น้ำหนักเซลล์เปียก) ต่อ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร

ได้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์เพิ่มขึ้นเป็น 4.97 กรัมต่อลิตร และ 52 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับหลังจากได้ปรับปรุงภาวะในการเลี้ยงเชื้อแล้ว Doi และคณะ (1988) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 โดยใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.2-0.3 กรัม(น้ำหนักเซลล์เปียก) ต่อ ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ 36 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่เมื่อใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.4 กรัม(น้ำหนักเซลล์เปียก) ต่อ ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตรได้ปริมาณโคพอลิเมอร์เพิ่มขึ้นเป็น 46 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

4.4 การศึกษาชนิดของกรดอินทรีย์และเกลือของกรดอินทรีย์บางชนิดเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยวสำหรับการสังเคราะห์และสะสม P(3HB-co-3HV)

จากผลการวิจัยการใช้กรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยวสำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์ โดย *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดโพรพิโอนิกได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.11 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 17.30 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และได้สัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV เท่ากับ 60 โมลเปอร์เซ็นต์ ส่วนอาหารที่เติมกรดบิวทิริกและกรดวาเลอริกได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ใกล้เคียงกัน แต่ในด้านสัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV พบว่ากรดวาเลอริกให้สัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV สูงสุดเท่ากับ 70 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจเนื่องจากกรดวาเลอริกเป็นสารตั้งต้นสำหรับ 3HV โดยตรง (ดังวิถีการสังเคราะห์ในรูปที่ 1.7) ในการเมตาโบไลซ์กรดวาเลอริก ส่วนใหญ่ได้เป็น 3HV โดยที่ไม่มีการตัดสายคาร์บอน ส่วนในกรดโพรพิโอนิกและกรดบิวทิริกวิถีการสังเคราะห์ 3HB และ 3HV จะเข้าสู่กระบวนการบีตาออกซิเดชั่น ซึ่งจะมีการตัดสายคาร์บอน ทำให้ได้สัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV ต่ำกว่า นอกจากนี้ยังศึกษากรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดกลูโคนิก กรดซอร์บิค และกรดซัคซินิก และเกลือของกรดอินทรีย์ ได้แก่ โซเดียมอะซิเตท โซเดียมซัคซิเนท และโซเดียม-4-ไฮดรอกซี-บิวทิเรท พบว่ากรดอินทรีย์และเกลือของกรดอินทรีย์ต่างๆ ที่กล่าวมาให้การเติบโตของ *Bacillus* sp.BA-019 รวมทั้งปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ได้ไม่สูงมากนัก และสัดส่วนสัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV ยังต่ำ มีเพียงกรดอินทรีย์ 3 ชนิดได้แก่ กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก และกรดวาเลอริกที่ให้การเติบโตและปริมาณโคพอลิเมอร์สูงพอควร ดังนั้นจึงเลือกกรดอินทรีย์ 3 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับโมโนเมอร์ของ 3HV ในการศึกษาขั้นต่อไป Steinbuchel และคณะ (1992) รายงานว่า *Alcaligenes eutrophus* ที่ผ่านการทำให้กลายพันธุ์สามารถใช้ กลูโคเนต อะซิเตท ซัคซิเนต และ แลคแตท เพื่อการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) โดยที่ได้สัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV อยู่ระหว่าง 4-7 โมลเปอร์เซ็นต์ Anderson และคณะ (1990)

และ Haywood และคณะ(1991) รายงานว่า *Rhodococcus* และ *Nocardia lucida* สามารถใช้กรดซัคซินิก กรดอะซิติก และกรดแลคติก เพื่อการสร้างและสะสมโคพอลิเมอร์ต่างๆได้ (อ้างถึงใน Steinbuchel และคณะ,1992)

4.5 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเติบโต สังเคราะห์และสะสมP(3HB-co-3HV)

จากผลการวิจัยพบว่าเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 เพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ที่มีกรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งพบว่าเวลาที่ 36 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อได้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 3.05 กรัมต่อลิตร และ 19.34 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และได้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 68 โมลเปอร์เซ็นต์ โดยที่สัดส่วนของ 3HV เพิ่มขึ้นตามเวลาของการเลี้ยงเชื้อ และค่อนข้างคงที่หลังจากเวลาที่ 36 ชั่วโมง การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ซึ่งมีรายงานการสังเคราะห์ และสะสมโคพอลิเมอร์โดย *Alcaligenes eutrophus* โดยใช้กรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเวลาที่ 48 ชั่วโมงเป็นเวลาที่เหมาะสมสำหรับการสร้างโคพอลิเมอร์ (Doi และคณะ, 1988 ; Kunioka และคณะ, 1989) Lee และคณะ(1995) รายงายการสังเคราะห์และสะสม P(3HB-co-3HV) โดย *Bacillus thuringensis* R-510 ในอาหารประกอบด้วยกลูโคสและกรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนผสม โดยใช้เวลาในการเลี้ยงเชื้อ 33 ชั่วโมง อัญชนา ศุรติขจร, 2537 รายงานว่าในการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) โดย*Alcaligenes* sp.A-04 ที่มีกรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดที่ เวลา 60 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ได้สัดส่วนของ 3HV สูงสุดเท่ากับ 97 โมลเปอร์เซ็นต์ โดยชั่วโมงที่ 48 ถึง 72 ค่าสัดส่วนของ 3HV ไม่แตกต่างกัน Takeda และคณะ(1995) ได้รายงานการผลิต P(3HB-co-3HV) โดย *Sphaerotilus natans* ที่ผ่านการทำให้กลายพันธุ์ พบว่าสัดส่วนของ 3HV สูงสุดเท่ากับ 60 โมลเปอร์เซ็นต์ในชั่วโมง ที่ 8 ของการเลี้ยง และลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 20 หลังจากนั้นค่อนข้างคงที่ได้สัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV เท่ากับ 26 โมลเปอร์เซ็นต์

4.6 การศึกษาแหล่งคาร์บอนผสมเพื่อการเติบโต สังเคราะห์และสะสมP(3HB-co-3HV3)

ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการเติบโตและปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้รวมทั้งชนิดและสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบของโคพอลิเมอร์ ดังนั้นการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนจึงมีความสำคัญอย่างมากในการสังเคราะห์ และ สะสมโคพอลิเมอร์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด

ได้พบว่า *Bacillus* sp.BA-019สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ดีกว่าน้ำตาลฟรุกโตสและกลูโคส และพบว่าน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมในการสังเคราะห์และสะสม PHB (รัตนศิริ มุฑิตากุล , 2538) แต่เนื่องจากในงานวิจัยนี้เป็นการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) จาก *Bacillus* sp.BA-019 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาน้ำตาลทรายขาว น้ำตาลฟรุกโตส และกลูโคส ผลจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลทรายขาวด้วยเครื่อง HPLC พบว่าประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสเพียงอย่างเดียวและใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อให้จุลินทรีย์มีการเติบโตได้ดีและให้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูง แหล่งคาร์บอนที่ให้โมโนเมอร์เป็น 3HB และ3HV ในงานวิจัยใช้กรดอินทรีย์ซึ่งได้แก่ กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก และกรดวาเลอริก ดังนั้นแหล่งคาร์บอนที่ใช้จึงเป็นแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลชนิดต่างๆ ผสมกับกรดอินทรีย์ที่เลือกแล้ว 3 ชนิด โดยมีปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร จากการทบทวนเอกสารในเรื่องการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) โดย *Alcaligenes* spp. งานวิจัยส่วนใหญ่ใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลฟรุกโตส หรือกลูโคส สำหรับเป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB จากการใช้น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลตาลฟรุกโตส และ กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนผสมกับกรดอินทรีย์ 3 ชนิด ผลการวิจัยพบว่าในอาหารแหล่งคาร์บอนผสมที่เติมน้ำตาลฟรุกโตส และ กลูโคส พบว่า *Bacillus* sp.BA-019 เติบโตได้ไม่ดีโดยได้น้ำหนักเซลล์แห้ง และ ปริมาณโคพอลิเมอร์ปริมาณที่ไม่สูงนัก โดยที่ *Bacillus* sp.BA-019สามารถเติบโตในอาหารที่เติมน้ำตาลฟรุกโตสได้ดีกว่ากลูโคส ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาวผสมกับกรดอินทรีย์ 3 ชนิด ผลการวิจัยพบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ เพิ่มขึ้นมากกว่าการใช้น้ำตาลฟรุกโตส หรือกลูโคส กล่าวคือ ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.14 2.57 และ 2.58 กรัมต่อลิตรได้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 39.17 27.63 และ 15.89 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ เนื่องจากว่าน้ำตาลทรายขาวยังมีราคาที่แพง จึงทำให้เกิดแนวความคิดว่า เชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 น่าจะใช้น้ำตาลทรายแดงซึ่งเป็นน้ำตาลซูโครสที่ไม่ผ่านการฟอกสี และราคาถูกกว่าน้ำตาลทรายขาว จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลทรายแดงด้วยเครื่อง HPLC พบว่าในน้ำตาลทรายแดงประกอบด้วย ซูโครส ฟรุกโตส และกลูโคส เท่ากับ 78.73 3.25 และ 2.28 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ตามลำดับ ดังนั้นจึงใช้น้ำตาลทรายแดงเป็นแหล่งคาร์บอนผสมกับกรดอินทรีย์ 3 ชนิด ผลการวิจัยพบว่า *Bacillus* sp.BA-019 สามารถเติบโตได้ดีได้น้ำหนักเซลล์แห้ง และ ปริมาณโคพอลิเมอร์เพิ่มขึ้นมากกว่าการใช้น้ำตาลชนิดอื่นๆที่ได้ศึกษามาแล้ว สาเหตุที่เชื้อสามารถเติบโตได้ดีอาจเนื่องจากว่าน้ำตาลทรายแดงยังไม่ผ่านการฟอกสี ซึ่งยังคงมีแร่ธาตุ และ วิตามิน รวมทั้งโคแฟกเตอร์บางอย่างที่จำเป็นต่อการเติบโตของ *Bacillus* sp.BA-019 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงนำกากน้ำตาลมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนผสม จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของกากน้ำตาลด้วยเครื่อง HPLC พบว่าในกากน้ำตาลประกอบด้วย ซูโครส ฟรุกโตส

และกลูโคส เท่ากับ 28.84 8.61 และ 5.98 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ตามลำดับ จึงใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนผสมกับกรดอินทรีย์ 3 ชนิด ผลการวิจัยพบว่าการเติบโต(น้ำหนักเซลล์แห้ง) และปริมาณโคพอลิเมอร์เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน โดยในอาหารที่ประกอบด้วยกากน้ำตาล 19.5 กรัมต่อลิตร และกรดโพรพิโอนิก 0.5 กรัมต่อลิตรได้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 54.43 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักเซล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.67 กรัมต่อลิตร จากผลการวิจัยนี้น้ำตาลซึ่งไม่มีความบริสุทธิ์ เช่น น้ำตาลทรายแดง และกากน้ำตาล อาจจะช่วยกระตุ้นการเติบโต การสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ของ *Bacillus* sp. BA-019 ให้เพิ่มมากขึ้น เป็นที่ทราบกันดีว่าในกากน้ำตาลนอกจากมีน้ำตาลองค์ประกอบหลัก 3ชนิดแล้วยังมีองค์ประกอบอื่นปะปนอยู่ด้วย ได้แก่ เกลือแร่ อินทรีย์ไนโตรเจน อาจจะเป็นสารที่ช่วยกระตุ้นการเติบโต การสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์โดย *Bacillus* sp. BA-019 ให้มีเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Page (1992) ศึกษาการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Azotobacter vinelandii* UWD เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลบริสุทธิ์ ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส เป็นต้น กับ น้ำตาลไม่บริสุทธิ์ ได้แก่ กากน้ำตาล malt extract corn syrup เป็นต้น เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการใช้น้ำตาลไม่บริสุทธิ์ให้ปริมาณ PHB มากกว่าการใช้น้ำตาลบริสุทธ์ อาจเป็นไปได้ว่าการเพิ่มปริมาณ PHA ในอาหารที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเพราะมีการเพิ่มสารอาหารอื่นที่สำคัญที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้ประโยชน์ ซึ่งในกากน้ำตาลประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุกโตสเท่า กับ 57 21 และ 20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลทั้งหมด นอกจากนี้ยังมีไนโตรเจนในรูปอินทรีย์ไนโตรเจน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโน บีเทน (betain) และสารที่ไม่ใช่ไนโตรเจน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดอินทรีย์ ประมาณ 11-12 เปอร์เซ็นต์ของส่วนที่เป็นของแข็งทั้งหมดในกากน้ำตาล (Page , 1989) Beaulieu และคณะ (1995) รายงานว่าการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิต PHB โดย *Alcaligenes eutrophus* กากน้ำตาล 0.3 กรัมต่อลิตร ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 23.06 กรัมต่อลิตร และ ปริมาณ PHB เท่ากับ 39 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง สาเหตุที่เชื้อเติบโตได้ดีเพราะว่าในกากน้ำตาลนอกจากประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิดแล้ว ยังมีแร่ธาตุ และ วิตามินต่างๆ เช่น ไทอะมีน ไรโบฟลาวิน ไพรีดอกซิน และไนอะซินาไมด์ (niacinamide) Page และคณะ (1997) รายงานว่า *Azotobacter salinestris* สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB-co-3HV) จากแหล่งคาร์บอนเดี่ยวที่เป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น กลูโคส ซูโครส เมไลไบโอส (melibiose) raw sugar corn syrup กากน้ำตาลจากหัวบีทและกากน้ำตาลจากอ้อย โดยมีสัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV อยู่ระหว่าง 5-12 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถเพิ่มโมโนเมอร์ 3HV ด้วยการเติมกรดโพรพิโอนิกลงในอาหาร เมื่อเปรียบเทียบโมโนเมอร์ 3HV ที่มาจากกรดโพรพิโอนิกกับกรดวาเลอริก พบว่ากรดโพรพิโอนิกให้โมโนเมอร์ 3HV สูงกว่ากรดวาเลอริก นอกจากนี้ยังนำกรดอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนผสมดังต่อไปนี้

กรดโพรพิโอนิกกับกรดบิวทิริก กรดโพรพิโอนิกกับกรดวาเลอริก และกรดวาเลอริกกับกรดบิวทิรก ผลการวิจัย พบว่าการเติบโตและปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ได้ต่ำกว่าแหล่งคาร์บอนผสมที่เป็นน้ำตาลกับกรดอินทรีย์ เมื่อพิจารณาเรื่องน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของกรด เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในแหล่งคาร์บอนผสมที่เติมกรดวาเลอริกพบว่าการเติบโตได้ไม่ดี ทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งปริมาณต่ำ รวมทั้งปริมาณโคพอลิเมอร์ก็ต่ำด้วย ซึ่งทั้งนี้อาจเกิดจากความเป็นพิษของกรดต่อเซลล์ของ *Bacillus* sp.BA-019 ก็อาจเป็นไปได้ Lee และคณะ(1995) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *Bacillus thuringensis* R-510 ในอาหารที่มีกลูโคสและเติมกรดโพรพิโอนิก 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อสังเคราะห์และสะสม P(3HB-co-3HV) ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.0 กรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกมากกว่า 0.3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีผลทำให้การเติบโตลดลง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกถึง 2.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าเชื้อ *Bacillus thuringensis* R-510 ไม่มีการเติบโต การเติมกรดโพรพิโอนิก 0.05-0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงในอาหารที่มีกลูโคส ซึ่งทำให้ได้สัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV เพิ่มขึ้นจาก 19.4 ถึง 80.2 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยนี้ที่พบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ *Bacillus* sp.BA-019 โดยเพิ่มความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก และกรดวาเลอริก *Bacillus* sp.BA-019 มีการเติบโตลดลง ซึ่งมีผลทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มลดลง แต่สัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกรด จาก 5 ถึง 25 โมลเปอร์เซ็นต์ Doi และคณะ (1988) ผลิต P(3HB-co-3HV) โดย *Alcaligenes eutrophus* ที่มีกรดบิวทิริกและกรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนผสมได้สัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV ระหว่าง 0-85 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของกรดทั้งสองชนิด นอกจากนี้สัดส่วนของโมโนเมอร์ยังขึ้นอยู่กับชนิดของกรดด้วย ซึ่งผลจากการวิจัยพบว่าอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนผสมเป็นกรดโพรพิโอนิกได้สัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV อยู่ระหว่าง 12-17 โมลเปอร์เซ็นต์ อาหารที่มีแหล่งคาร์บอนผสมเป็นกรดบิวทิริก ได้สัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV อยู่ระหว่าง 4-9 โมลเปอร์เซ็นต์ และอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนผสมเป็นกรดวาเลอริก ได้สัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV อยู่ระหว่าง 20-30 โมลเปอร์เซ็นต์ สรุปได้ว่าแหล่งของคาร์บอนผสมมีผลต่อการเติบโต ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนโมโนเมอร์ จากการทบทวนเอกสารของงานวิจัยเกี่ยวกับกลไกการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) โดย *Bacillus* sp. ยังไม่พบรายงานการวิจัยที่แน่นอนเกี่ยวกับเรื่องนี้ ซึ่งแตกต่างจากวิถีการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) โดย *Alcaligenes* spp. ที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย ซึ่ง Doi และคณะ (1987) ได้รายงานวิถีการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV)โดย *Alcaligenes* sp. เมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว ได้สัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV สูงถึง 90 โมลเปอร์เซ็นต์ อธิบายได้ว่ากรดวาเลอริกถูกเมตาโบไลซ์ด้วยปฏิกิริยาบีตาออกซิเดชั่น เป็น D-3-hydroxyvaleryl-CoA ซึ่งเปลี่ยนเป็น 3HV โดยตรงที่ไม่มีการตัดสายคาร์บอน

ดังได้แสดงวิถีการสังเคราะห์ในรูปที่ 1.7 ในขณะที่เมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกอาจอธิบายได้จากวิถีการสังเคราะห์ที่เสนอโดย Senior และ Dawes (1973) Oeding และ Schlegel (1973) ซึ่งเสนอไว้ว่าในการสังเคราะห์ 3HV เกิดจากการรวมตัวของ acetyl-CoA ซึ่งได้จากเมตาโบลิซึมของกรดโพรพิโอนิกกับ propionyl-CoA ดังนั้นจึงพบว่าสัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV ต่อ 3HB เมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนจะต่ำกว่าเมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Doi และคณะ (1990) ดังแสดงวิถีสังเคราะห์ในรูปที่ 1.6 ส่วนวิถีการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) ในอาหารที่มีกรดบิวทิริกเป็นแหล่งคาร์บอน กรดบิวทิริกถูกเมตาโบไลซ์ได้เป็น 3- ketobutyl-CoA แล้วถูกเมตาโบไลซ์ต่อโดยเอนไซม์ 3-ketoacyl-CoA thiolase ได้เป็น acetyl-CoA ซึ่งถูกเมตาโบไลซ์ต่อโดยเอนไซม์ 3-ketoacyl-CoA thiolase ได้เป็น 3 – ketovaleryl-CoA แล้วในที่สุดถูกเมตาโบไลซ์ได้เป็น 3HV ดังแสดงวิถีการสังเคราะห์ในรูปที่ 1.9 Takeda และคณะ(1995) รายงานว่า *Sphaerotilus natnas*ที่ผ่านการทำให้กลายพันธุ์สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB-co-3HV) โดยใช้กรดบิวทิริกเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว แต่ได้สัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV ยังไม่สูงพอ

4.7 การศึกษาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนจำกัดสำหรับการเติบโต สังเคราะห์และสะสม P(3HB-co-3HV)

นอกจากแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการเติบโตและการผลิต PHA การจำกัดสารอาหารบางชนิดได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสเฟต และแมกนีเซียม เป็นต้น มีผลต่อปริมาณ PHA ที่เชื้อสังเคราะห์และสะสม (Anderson , 1990) ไนโตรเจนเป็นสารอาหารที่จำเป็นซึ่งจุลินทรีย์ต้องการในช่วงการเจริญเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ แต่ในช่วงที่มีการสังเคราะห์และสะสม PHA มีรายงานว่าการจำกัดปริมาณไนโตรเจน โดยมีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ มีส่วนช่วยการกระตุ้น ให้เซลล์เกิดการสังเคราะห์และสะสม PHA เพิ่มขึ้น (Beaulieu และคณะ ,1995) ในงานวิจัยนี้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ศึกษาคือ แอมโมเนียมซัลเฟตใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1ถึง 2.0กรัมต่อลิตร เติมลงในอาหาร MSM ที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลเท่ากับ 19.5 กรัมต่อลิตร กับกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนผสม ผลการวิจัยพบว่า เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอต่อการเติบโต การสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนจำกัดที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) ของ *Bacillus* sp.BA-019 เท่ากับ

0.1 กรัมต่อลิตร โดยได้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 54.54 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง จากผลการวิจัย C/N ที่มีผลต่อการเติบโต การสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์พบว่า C/N เท่ากับ 300 โมล/โมล เป็นอัตราส่วนที่เหมะสมโดยได้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นจาก 5.67 กรัมต่อลิตร เป็น 6.75 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ เท่ากับ 50.38 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และผลการวิจัยนี้พบว่าการจำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจนไม่มีผลต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ Beaulieu และคณะ (1995) ศึกษาถึงอิทธิพลของเกลือแอมโมเนียมรูปต่าง ๆ ในอาหารที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes eutrophus* พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตมีผลต่อการสังเคราะห์และสะสม PHB มากกว่าเกลือแอมโมเนียมรูปอื่นๆ เช่น แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมฟอสเฟต เป็นต้น ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Daniel และคณะ (1992) พบว่าปริมาณ PHB ที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp.135 ซึ่งมีการจำกัดปริมาณเกลือแอมโมเนียมในรูปต่างๆ นั้นไม่มีผลต่อปริมาณ PHB ที่ผลิตได้

4.8 การศึกษาสมบัติทางกายภาพบางประการของ P(3HB-co-3HV) บางชนิดที่สังเคราะห์และสะสมโดย *Bacillus* sp.BA-019

ค่าน้ำหนักโมเลกุลของโคพอลิเมอร์ที่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากวิธีการสกัดแยก รวมทั้งภาวะในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ ค่าพีเอชของอาหาร อุณหภูมิ ชนิดและปริมาณของสารอาหารที่จำเป็นต่อการสร้างและสะสม PHA (Ballard และคณะ ,1987) จากผลการวิจัยนี้พบว่า *Bacillus* sp.BA-019 สังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) ซึ่งมีสัดส่วนโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV แตกต่างกัน เมื่อได้วิเคราะห์ค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของพอลิเมอร์บางชนิด พบว่าได้ค่า M_w อยู่ในช่วง 2.98×10^5 ถึง 4.63×10^6 และค่า M_n อยู่ในช่วง 1.17×10^5 ถึง 3.16×10^6 และมีค่า PDI อยู่ระหว่าง 1.39-2.54 ซึ่งเมื่อเปรียบกับผลการวิจัยของ Lee และคณะ (1995) รายงานว่า *Bacillus thuringiensis* R-510 ผลิต PHA ได้น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย อยู่ในช่วง 53,000 ถึง 65,000 และมีค่า PDI ระหว่าง 1.5 - 2.2 อาจเป็นไปได้ว่าน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันนั้นขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอน รวมทั้งวิธีขั้นตอนการสกัดและทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ (Chen และ Page, 1994 ; Hori และคณะ, 1994 ; Kusaka และคณะ ,1997 ; Quagliano และ Miyazaki ,1997) Brand และคณะ(1990) รายงานว่าวิธีใช้คลอโรฟอร์มในการสกัด PHA จากจุลินทรีย์ สามารถสกัด PHA ที่มี M_w เท่ากับ 1.5×10^6 M_n เท่ากับ 1.1×10^6 และ PDI เท่ากับ 1.4 ในขณะที่วิธีใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์สกัด PHA ได้ M_w เท่ากับ 0.94×10^6 M_n เท่ากับ 0.37×10^6 และ PDI

เท่ากับ 2.5 เนื่องจากว่าโซเดียมไฮโปคลอไรท์เป็นสารเคมีที่มีความรุนแรงสามารถทำลายพันธะของพอลิเมอร์ให้เป็นสายสั้นๆ ซึ่งมีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยต่ำลงและค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลกว้างขึ้น (PDI > 1) Hahn และคณะ (1995) พบว่า M_w ของ PHB ที่ผลิตโดย *Alcaligenes eutrophus* มีค่าลดลงจากเดิมเมื่อสกัด PHB โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ปริมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) งานวิจัยนี้ได้ใช้วิธีการสกัดโคพอลิเมอร์ออกจากเซลล์ด้วยคลอโรฟอร์มและผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนในเฮกเซนอย่างช้าๆหลายๆ ครั้งเพื่อให้สารผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์ และสามารถใช้เฮกเซนหมุนเวียนเพื่อตกตะกอนซ้ำได้อีก การตกตะกอนของพอลิเมอร์อย่างช้าๆ ในเฮกเซนมีผลดีทำให้โคพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงตกตะกอนลงมาก่อน จึงสามารถกำจัดโคพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำได้เนื่องจากจะแขวนลอยอยู่ในเฮกเซน Taidi และคณะ (1993) ศึกษาผลของชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน ที่มีต่อ M_w ของ PHB ที่ผลิตโดย *Methylobacterium extorquens* เมื่อเปรียบเทียบในอาหารที่เติมโซเดียมซัคซิเนต และเมทธานอล เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า PHB ที่มีค่า M_w สูงในอาหารที่เติมซัคซิเนตเป็นแหล่งคาร์บอน มีค่าเท่ากับ 1.7×10^6 มากกว่าค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย PHB ที่ได้จากเมทธานอลเป็นแหล่งคาร์บอน จากการวิจัยของ Holems (1985) Mimota (1987) Scandola และคณะ(1992) Nakamura และ Doi (1992) พบว่าโฮโมพอลิเมอร์ P(3HB)มีค่าระดับความเป็นผลึกสูง (crystallinity) หรือมีบริเวณที่เป็นผลึก (crystalline) มาก เมื่อมีโมโนเมอร์ชนิดอื่นเช่น 3HV และ 4HB อยู่ในสายพอลิเมอร์มีผลทำให้ระดับความเป็นผลึกลดลงบริเวณที่เป็นอสัณฐาน(amorphous) เพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เช่น ค่า Tg และ Tm ลดลง จากผลการวิจัยนี้ค่า Tm ลดลงจาก 168 °ซ ถึง 143 °ซ และค่า Tg ลดลงจาก 6 °ซ ถึง -3 °ซ เมื่อเพิ่มสัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV จาก 7 ถึง 13 โมลเปอร์เซ็นต์ Organ และ Barham (1986) ศึกษาผลของโมโนเมอร์ 3HV ต่อสมบัติด้านต่างๆ พบว่าโคพอลิเมอร์ที่สัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV เพิ่มมากขึ้นจะไปลดระดับความเป็นผลึก และลดค่า Tg และ Tm ส่งผลให้โคพอลิเมอร์มีความเหนียวและใสมากขึ้น โดยที่โคพอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV ไม่เกิน 40 โมลเปอร์เซ็นต์ จะมีผลทำให้ค่า Tg และ Tm ลดลง ซึ่งโคพอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV ในช่วง 40 โมลเปอร์เซ็นต์ มีค่า Tm ต่ำสุดเท่ากับ 75 °ซ (Doi , 1990)

สรุปผลงานวิจัย

1. ปรับปรุงอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อสำหรับ *Bacillus* sp. BA-019 เพื่อให้ได้กล้าเชื้อปริมาณมากขึ้น โดยมีน้ำตาลฟรุกโตสเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ และพบว่าใช้ฟรุกโตสได้ปริมาณที่เหมาะสมเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร
2. กล้าเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง เป็นกล้าเชื้อที่มีการเติบโตได้ดี ในอาหารเพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) และมีความเหมาะสมในการสังเคราะห์ และสะสมโคพอลิเมอร์
3. ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) โดย *Bacillus* sp. BA-019 เท่ากับ 0.18 กรัม (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ต่อปริมาณอาหาร 50 มิลลิลิตร และเวลาที่เหมาะสมในการผลิตโคพอลิเมอร์ ในอาหาร MSM ซึ่งมีกรดโพรพิโอนิก เป็นแหล่งคาร์บอน เท่ากับ 36 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ
4. *Bacillus* sp. BA-019 สามารถเติบโต สังเคราะห์และสะสมP(3HB-co-3HV) จากแหล่งคาร์บอนเดี่ยวที่เป็นกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก กรดวาเลอริก กรดซอร์บิก กรดกลูโคนิก กรดแลคติก และกรดซัคซินิก เกลือของกรดอินทรีย์ ได้แก่ โซเดียมอะซิเตท โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท และ โซเดียมซัคซิเนท โดยมีสัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV ระหว่าง 6-70 โมลเปอร์เซ็นต์ พบว่าการเติบโต สังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์สูงสุดในอาหารที่มีกรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก กรดวาเลอริกตามลำดับ
5. *Bacillus* sp. BA-019 เติบโต สังเคราะห์และสะสมP(3HB-co-3HV) ซึ่งมีสัดส่วนของโมโนเมอร์ต่างๆ โดยพบว่าสัดส่วนโมโนเมอร์3HVเท่ากับ 4-30 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง ฟรุกโตส กลูโคส และ กากน้ำตาล ผสมกับกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก และกรดวาเลอริก แหล่งคาร์บอนผสมที่พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 มีการเติบโต และผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) ได้สูงสุด ได้แก่ กากน้ำตาล กับ กรดโพรพิโอนิก (53.43 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) รองลงมาได้แก่ น้ำตาลทรายขาว กับ กรดบิวทิริก (39.17 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) และ น้ำตาลทรายแดง กับ กรดบิวทิริก (38.09 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ตามลำดับ เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาล (น้ำตาลรวมปริมาณ 19.5 กรัมต่อลิตร) กับกรดโพรพิโอนิก (0.5 กรัมต่อลิตร) ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 5.67 กรัมต่อลิตร และได้โคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) สูงสุด เท่ากับ 53.43 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
6. *Bacillus* sp. BA-019 มีการเติบโต สังเคราะห์และสะสมP(3HB-co-3HV) โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมที่เป็น กรดอินทรีย์ 2 ชนิด ได้แก่ กรดโพรพิโอนิก กับกรดบิวทิริก กรดโพรพิโอนิกกับกรดวาเลอริก และ กรดบิวทิริกกับกรดวาเลอริก แต่ปริมาณรวมของแหล่งคาร์บอนผสมที่เป็นกรดอินทรีย์ต้องใช้ในปริมาณต่ำ (5 กรัมต่อลิตร) โดยพบว่าการเติบโต สังเคราะห์และสะสม

โคพอลิเมอร์ได้สูงสุดในแหล่งคาร์บอนผสมที่เป็นกรดวาเลอริก กับ กรดบิวทิริก ได้สัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV สูงที่สุดเท่ากับ 30 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นกรดโพรพิโอนิกกับ กรดวาเลอริก

7. แหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนียมซัลเฟต) จำกัด ปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการเติบโต สังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) เท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลและ กรดโพรพิโอนิก ปริมาณเท่ากับ 19.5 และ 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ *Bacillus* sp. BA-019 มีการเติบโตได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.06 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 54.54 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนผสม (กากน้ำตาลและกรดโพรพิโอนิก) ต่อไนโตรเจน (C/N) ที่เหมาะสมเท่ากับ 300 (mol/mol)
8. น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (Mw) ของ P(3HB-co-3HV) บางชนิดที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 มีค่าเท่ากับ 2.98×10^5 - 4.63×10^6 และค่าการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่นำไปวิเคราะห์ที่ต่ำสุดเท่ากับ 1.39 สมบัติของแผ่นฟิล์มโคพอลิเมอร์ที่วิเคราะห์ เช่น ค่า Tg อยู่ระหว่าง 168 °ซ ถึง 143 °ซ และค่า Tm อยู่ในช่วง 6°ซ ถึง 3 °ซ ซึ่งสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ที่แตกต่างกันทำให้สมบัติทางกายภาพของพอลิเมอร์แตกต่างกัน