ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการเติบโตของ *Bacillus* sp. BA-019 และการผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)

นายพิสิษฐ คงกำเนิด

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-639-042-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF CARBON AND NITROGEN SOURCES ON GROWTH OF *BACILLUS* SP. BA-019 AND PRODUCTION OF POLY (3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE)

Mr. PISIT KHUNGGUMNERD

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1997

ISBN 974-639-042-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการเติบโตของ *Bacillus* sp. BA-019 และการผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)
โดย	นายพิสิษฐ คงก่าเนิด
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. บุษบา ยงสมิทธ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

พิสิษฐ คงกำเนิด : ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการเติบโตของ *Bacillus* sp. BA-019 และการผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) (EFFECT OF CARBON AND NITROGEN SOURCES ON GROWTH OF *Bacillus* sp. BA-019 AND PRODUCTION OF POLY(3- HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE)

อ. ที่ปรึกษา รศ.ดร. ส่งศรี กุลปรีชา, 126 หน้า. ISBN 974-639-042-2

ในการศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV)โดย *Bacillus* sp. BA-019 พบว่ากล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตและการผลิตโคพอลิเมอร์เป็นกล้าเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อซึ่งประกอบด้วยฟรุกโตสปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร และปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ใช้เท่ากับ 0.18 กรัม(น้ำหนักเซลล์แห้ง)ต่อปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM ซึ่งประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) เลี้ยงเชื้อนานเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ได้ศึกษาการใช้กรดอินทรีย์บางชนิดและเกลือของกรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว พบว่ามีการเติบโตและได้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก และกรดวาเลอริก ซึ่งได้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV อยู่ในช่วง 5-70 โมลเปอร์เซ็นต์ ได้ปริมาณ P(3HB-co-3HV) สูงสุดเมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอน(17.30 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลชนิดต่างๆกับกรดอินทรีย์ พบว่าได้ปริมาณ P(3HB-co-3HV) ใกล้เคียงกันในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลทรายขาวหรือน้ำตาลทรายแดงผสมกรดบิวทิริก (39.17 และ 38.09 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ) *Bacillus* sp. BA-019 มีการเติบโตได้ใกล้เคียงกันในแหล่งคาร์บอนผสมที่เป็นกรดอินทรีย์ 2 ชนิด (กรดโพรพิโอนิกกับกรดบิวทิริก กรดโพรพิโอนิกกับกรดวาเลอริก และกรดบิวทิริกกับกรดวาเลอริก) ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนผสมเป็นกรดวาเลอริก กับกรดบิวทิริก เท่ากับ 29.30 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ได้สัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV สูงสุดเท่ากับ 30 โมลเปอร์เซ็นต์เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นกรดโพรพิโอนิกกับกรดวาเลอริก พบว่ากากน้ำตาลกับกรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนผสมที่มีผลให้การเติบโตและการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) ได้สูงสุดโดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ 5.67 กรัมต่อลิตร และ 53.43 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ แหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนียมซัลเฟต) ปริมาณจำกัดสำหรับการเติบโตและการผลิต P(3HB-co-3HV) เท่ากับ0.1 กรัมต่อลิตรเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลและกรดโพรพิโอนิก โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 5.06 กรัมต่อลิตร และ 54.54 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ ได้สัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 16 โมลเปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอน (กากน้ำตาลกับกรดโพรพิโอนิก) ต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมเท่ากับ 300 โมลต่อโมล โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 6.75 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณ P(3HB-co-3HV) เท่ากับ 50.38 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และได้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 16 โมลเปอร์เซ็นต์ น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้อยู่ในช่วง 2.98×10^5 - 4.63×10^6 ค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยที่ต่ำสุดของโคพอลิเมอร์บางชนิดที่นำไปวิเคราะห์เท่ากับ 1.39 พบว่าแผ่นฟิล์มโคพอลิเมอร์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งมีสัดส่วนโมโนเมอร์ต่างกันมีสมบัติทางกายภาพบางประการแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HB และ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบ

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต พิสิษฐ คงกำเนิด

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ส่งศรี กุ

ปีการศึกษา 2540 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม —

ภาพถ่ายจากบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เป็นเพียงหน้าเดียว

C726391 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD. Bacillus sp. / POLY (3-HYDROXYBUTYRATE-co-3-HYDROXYVALERATE)

PISIT KHUNGGUMNERD : EFFECT OF CARBON AND NITROGEN SOURCES ON GROWTH OF *Bacillus* sp. BA-019 AND PRODUCTION OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE). THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SONGSRI KULPREECHA, Ph.D. 126 pp. ISBN 974-639-042-2

In the study of copolymer P(3HB-co-3HV) production by *Bacillus* sp. BA-019, 0.18 g(cell dry wt.) per 50 ml medium of 24 h-culture cultivated in seed culture medium containing with 10 g/l of fructose was suitable as seed culture for growth and copolymer production. Synthesis and accumulation of P(3HB-co-3HV) was investigated in MSM medium containing 20 g/l of carbon source, 1.0 g/l of ammonium sulfate and cultivation period was 36 h. Using some organic acids and their salts as single carbon source, high amount of cell mass and copolymer content was obtained in the medium containing propionic acid, butyric acid and valeric acid which the mole fraction of 3HV monomer was in the range of 5-70 mole percent. The highest P(3HB-co-3HV) content was detected in the medium containing propionic acid as carbon source (17.30 percent by dry wt). When some kind of sugars and organic acids were used as mixed carbon-sources, almost some P(3HB-co-3HV) content was determined when carbon source used were refine sugar and brown mixed with butyric acid (39.17 and 38.09 percent by dry wt , respectively). Almost equal amount of cell mass of *Bacillus* sp. BA-019 was determined in the mixed carbon source using 2 kinds of organic acids. (i.e. propionic acid and butyric acid, propionic acid and valeric acid, butyric acid and valeric acid), the highest copolymer content (29.30 percent by cell dry wt.) was detected in the medium containing valeric acid and butyric acid. The highest mole fraction of 3HV (30 mole percent) was formed in the mixed carbon-source of propionic acid and valeric acid. Maximum growth (5.67 g/l cell dry wt) and high P(3HB-co-3HV) synthesis (53.43 percent by dry wt.) was observed in the medium containing cane molasses and propionic acid. Limited amount of nitrogen source (ammonium sulfate) for growth and P(3HB-co-3HV) production was 0.1 g/l using cane molasses and propionic acid as carbon-source; maximum cell dry wt. and highest copolymer content were 5.06 g/l and 54.54 percent by cell dry wt., respectively with 16 mole percent of 3HV was obtained. Optimal C/N (cane molasses and ammonium sulphate) ratio for growth and copolymer production was 300 mole/mole; 6.75 g/l of cell dry wt. and 50.38 percent by cell dry wt. of P (3HB-co-3HV) with 16 mole percent of 3HV were determined. Average molecular weight (M_w) of some copolymers P (3HB-co-3HV) produced by *Bacillus* sp. BA-019 was in the range of 2.98×10^5-4.63×10^6 and 1.39 was the lowest PDI of some copolymer analysed. The copolymer films produced by *Bacillus* sp. BA-019 with various mole fraction of monomer possess different physical properties which due to the composition of 3HB and 3HV in the copolymers.

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต ปิสิษฐ คงกุ้มเกิด

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2540 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม –

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเสร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ท่านได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำอันมีค่า และข้อคิดเห็นต่างๆ ของงานด้วยดีตลอดมา รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ศิษย์ขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงสุดไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. บุษบา ยงสมิทธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม ที่กรุณารับเป็นก่รรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ใช้เครื่อง differential scanning calorimeter

ขอขอบคุณพี่ๆ เจ้าหน้าที่ของภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆร่วมภาควิชาทุกท่าน ที่ได้ให้กำลังใจ ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยด้วยดีตลอดมา

งานวิจัยนี้ส่วนหนึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย ดังนั้นจึงขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ๆ ที่คอยเป็นกำลังใจและกำลังทรัพย์อย่างดียิ่งในการทำวิทยานิพนธ์ตั้งแต่เริ่มต้นจนเสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ฌ

สารบัญรูป.....ฎ

คำย่อ.....ฑ

บทที่

1 บทนำ.....1

PHA.....4

การค้นพบ PHA.....6

โครงสร้างของ PHA.....7

วิถีการสังเคราะห์ PHB.....9

วิถีการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV).....10

การสร้างและสะสม PHA โดย *Bacillus* sp. BA-019 และแบคทีเรียบางชนิด.....15

แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิต PHA.....16

การผลิต PHA จากแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก.....18

สมบัติทางกายภาพและเชิงกลของ PHA.....22

การผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม.....24

การนำ PHA ไปใช้ประโยชน์.....26

มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย.....27

ขั้นตอนดำเนินการวิจัย.....28

2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์.....30

วิธีการเก็บรักษาเชื้อและการเตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงเป็นกล้าเชื้อ.....33

การศึกษาการเติบโตของ *Bacillus* sp. BA-019.....35

หน้า

การศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนผสม เพื่อการสร้างโคพอลิเมอร์ P(3HV-co-3HB)ที่มีปริมาณและสัดส่วนของโมโนเมอร์ต่างๆ.....37
การศึกษาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมเพื่อการสร้างโคพอลิเมอร์สูงสุด.....38
วิธีการวิเคราะห์.....39
3 ผลการทดลอง.....43
4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....86
รายการอ้างอิง.....100
ภาคผนวก
ก การเตรียมกราฟมาตรฐาน และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....107
ข สูตรคำนวณ.....111
ค กราฟมาตรฐาน.....113
ประวัติผู้เขียน.....126

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้าที่

1.1 เปรียบเทียบสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของ PP และ PHB.....3

1.2 การสร้างและสะสม PHA โดยจุลินทรีย์.....5

1.3 ราคาต้นทุนการผลิต PHB จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ.....21

1.3 บริษัทผู้ผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม.....25

3.1 การแปรผันอายุกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ที่มีกรดโพรพิโอนิก 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณกล้าเชื้อเริ่ม ต้นเท่ากับ 0.11 กรัมต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร.....47

3.2 เปรียบเทียบการเติบโตและปริมาณโคพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์และสะสมโดย *Bacillus* sp.BA-019เมื่อแปรผันปริมาณกล้าเชื้อ โดยใช้กล้าเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ที่มีกรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอน.....50

3.3 การใช้กรดอินทรีย์และเกลือของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์ โดย *Bacillus* sp.BA-019.....52

3.4 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกและปริมาณแอมโมเนียมที่เหลือ ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนโมโนเมอร์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ที่เวลาต่าง ๆ เมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว.....54

3.5.ก เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทรายขาวและกรดโพรพิโอนิก (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร).....56

3.5.ข เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่าง น้ำตาลทรายขาวและกรดบิวทิริก (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร).....57

3.5.ค เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทรายขาวและกรดวาเลอริก (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร).....67

3.6.ก เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกลูโคสกรดโพรพิโอนิก (ปริมาณรวมเท่ากับ20กรัมต่อลิตร).....60

ตารางที่ หน้าที่

3.6.ข เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่าง กลูโคสและ กรดบิวทิริก (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร).....60

3.6.ค เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่าง กลูโคสและ กรดวาเลอริก (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร).....61

3.7.ก เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างฟรุกโตสและ กรดโพรพิโอนิก (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร).....63

3.7.ข เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างฟรุกโตสและ กรดบิวทิริก (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร).....64

3.7.ค เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่าง ฟรุกโตสและกรดวาเลอริก (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร).....64

3.8.ก เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดโพรพิโอนิก และน้ำตาลทรายแดง(ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร).....67

3.8.ข เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทรายแดง และกรดบิวทิริก(ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร).....68

3.8.ค เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทรายแดง และกรดวาเลอริก(ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร).....68

3.9.ก เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก(ปริมาณรวมเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร).....71

3.9.ข เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดโพรพิโอนิก และกรดวาเลอริกริก(ปริมาณรวมเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร).....71

ตารางที่ หน้าที่

3.9.ค เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดวาเลอริก และกรดบิวทิริก (ปริมาณรวมเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร).....72

3.10.ก เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกากน้ำตาล และกรดโพรพิโอนิก.....75

3.10.ข เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกากน้ำตาล และกรดบิวทิริก.....76

3.10.ค เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกากน้ำตาล และกรดวาเลอริก(ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร).....77

3.11 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ สัดส่วนโมโนเมอร์ และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกากน้ำตาล 19.5 กรัมต่อลิตร และกรดโพรพิโอนิก 0.5 กรัมต่อลิตร และแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต.....81

3.12 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ สัดส่วนของโมโนเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน ; C/N เท่ากับ 75 150 225 300 และ 375 (โมลต่อโมล) โดยที่มีคาร์บอนผสมเป็นกากน้ำตาล และกรดโพรพิโอนิก แหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัมต่อลิตร.....82

3.13 ค่าอุณหภูมิการหลอมเหลว อุณหภูมิกลาสทรานซิชั่น ของโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) จาก *Bacillus* sp. BA-019 สัดส่วนของโมโนเมอร์แตกต่างกัน..... 83

3.14 น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน และค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักของโคพอลิเมอร์ P(3HB-CO-3HV) บางชนิดที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019.....84

สารบัญรูป

รูปที่		หน้าที่
1.1	วัฏจักรของ PHA	4
1.2	สูตรโครงสร้างของ PHA	7
1.3	สูตรโครงสร้างของ PHB	9
1.4	วิถีการสังเคราะห์และย่อยสลาย PHB	9
1.5	สูตรโครงสร้างของ P(3HB-co-3HV)	10
1.6	วิถีการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) โดยใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว ใน *Alcaligenes eutrophus*	10
1.7	วิถีการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) โดย *Alcaligenes eutrophus* เมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว	11
1.8	วิถีการสังเคราะห์ PHB และ P(3HB-co-3HV) โดย *Aztobacter salinestris* จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ	12
1.9	วิถีการสังเคราะห์ PHB และ P(3HB-co-3HV) ที่มีกรดบิวทิริกและกรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน ใน *Alcaligenes eutrophus*	13
1.10	วิถีการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) โดย recombinant *E.coli* เมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกและกรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน	14
3.1.ก-ข	เปรียบเทียบการเติบโต ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตและปริมาณฟรุกโตสที่เหลือเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อชุดควบคุม อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อซึ่งประกอบด้วยฟรุกโตสปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร	44
3.1.ค-ง	เปรียบเทียบการเติบโต ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตและปริมาณฟรุกโตสที่เหลือเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อซึ่งประกอบด้วยฟรุกโตสปริมาณ 10 15 กรัมต่อลิตร	45
3.2	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดที่ได้เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหาร MSM ซึ่งมีกรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์เมื่อแปรผันอายุกล้าเชื้อ	48
3.3	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์โดย *Bacillus* sp.BA-019 ที่มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นต่างกัน เมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอน	50

รูปที่ หน้าที่

3.4 การเติบโต ปริมาณกรดโพรพิโอนิกและแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือและปริมาณโคพอลิเมอร์ ที่สังเคราะห์และสะสมโดย *Bacillus* sp. BA-019 ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอน.....54
3.5 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์และสะสมจาก *Bacillus* sp.BA-019เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นน้ำตาลทรายขาวผสมกรดอินทรีย์.....58
3.6 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์และสะสมจาก *Bacillus* sp.BA019เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นกลูโคสผสมกรดอินทรีย์.....61
3.7 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์และสะสมจาก *Bacillus* sp.BA-019เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นฟรุกโตสผสมกรดอินทรีย์.....65
3.8 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลทรายแดงผสมกรดอินทรียเป็นแหล่งคาร์บอนผสม.....69
3.9 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ได้สูงสุดที่สังเคราะห์และสะสมจาก*Bacillus* sp.BA-019 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นกรดอินทรีย์สองชนิด.....72
3.10 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์และสะสมจาก *Bacillus* sp.BA-019เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นกากน้ำตาลผสมกรดอินทรีย์.....78
3.11 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลและกรดโพรพิโอนิกโดยแปรผันปริมาณไนโตรเจน.....81
3.12 ลักษณะแผ่นฟิล์มโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-01986.....84
3.13 เปรียบเทียบโครมาโตแกรมแสดงระดับความเป็นผลึกของดคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) ซึ่งผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ที่มีสัดส่วนโมโนเมอร์แตกต่างกัน จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี XRD.....85

คำย่อ

คำย่อ	คำอธิบาย
°ซ	องศาเซลเซียส
นน. เซลล์แห้ง	น้ำหนักเซลล์แห้ง
มล.	มิลลิลิตร