การผลิตกรดอาร์-(-)-3-ไฮดรอกซีบิวไทริก โดยการดีพอลิเมอไรเซชันในเซลล์ของ *Bacillus* sp. BA-019

นางสาวกุสุมา กมลจรัสโสภา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6204-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

R-(-)-3-HYDROXYBUTYRIC ACID PRODUCTION BY DEPOLYMERIZATION IN *Bacillus* sp. BA-019

Miss Kusuma Kamoljaratsopha

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2004

ISBN 974-17-6204-6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตกรดอาร์-(-)-3-ไฮดรอกซีบิวไทริกโดยการดีพอลิเมอไรเซชันในเซลล์ของ *Bacillus* sp. BA-019
โดย	นางสาวกุสุมา กมลจรัสโสภา
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวกุสุมา กมลจรัสโสภา : การผลิตกรดอาร์-(-)-3-ไฮดรอกซีบิวไทริกโดยการดีพอลิเมอไรเซชันในเซลล์ของ *Bacillus* sp. BA-019. (R-(-)-3-HYDROXYBUTYRIC ACID PRODUCTION BY DEPOLYMERIZATION IN *Bacillus* sp. BA-019) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ส่งศรี กุลปรีชา, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.อมร เพชรสม จำนวนหน้า 120 หน้า. ISBN 974-17-6204-6.

การศึกษาการผลิตกรดอาร์-(-)-3-ไฮดรอกซีบิวไทริกจาก PHB โดยปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 พบว่าเซลล์สามารถผลิต PHB ได้ปริมาณมาก เมื่อใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.67 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 2.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 44.40 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อมีการเพิ่มปริมาณสารละลาย trace element เป็น 2 มิลลิลิตรต่อลิตร พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.55 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้น PHB เพิ่มขึ้นเป็น 2.54 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 55.75 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นนำเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ที่มีการสะสม PHB สูงที่สุดไปทำปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน ซึ่งตรวจหากิจกรรมของปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันนี้จากปริมาณโมโนเมอร์ R3HB ที่ได้ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสำหรับปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน โดยเมื่อนำเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ไปกระจายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ บ่มสารผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส, ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ในภาวะที่ไม่มีการเขย่า พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เซลล์สามารถผลิตโมโนเมอร์ R3HB ได้สูงสุด มีความเข้มข้นเท่ากับ $0.36 \pm 9.47 \times 10^{-2}$ กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณโมโนเมอร์ R3HB เท่ากับ 13.95 เปอร์เซ็นต์ต่อ PHB เริ่มต้น แต่เมื่อบ่มสารผสมปฏิกิริยาในภาวะที่มีการเขย่าไม่พบโมโนเมอร์ R3HB เมื่อบ่มสารผสมปฏิกิริยาที่ pH เริ่มต้นในช่วงเท่ากับ 2.0-10.0 พบว่าปริมาณโมโนเมอร์ R3HB ที่ได้ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อควบคุมค่า pH ของสารผสมปฏิกิริยาด้วยบัฟเฟอร์ให้เท่ากับ 4.0-9.0 พบว่าที่ค่า pH เท่ากับ 5.5 เซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตโมโนเมอร์ R3HB สูงที่สุด ปริมาณของโมโนเมอร์ R3HB เท่ากับ $1.62 \pm 5.11 \times 10^{-2}$ กรัมต่อลิตร คิดเป็น 94.74 เปอร์เซ็นต์ต่อ PHB เริ่มต้น แต่ที่ค่า pH เท่ากับ 4.0 ไม่พบโมโนเมอร์ R3HB เมื่อนำเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 หลังทำปฏิกิริยาดีพอลิเมไรเซชัน ทั้งที่ pH เท่ากับ 4.0 และ 5.5 ไปตรวจหาโมโนเมอร์ R3HB ภายในเซลล์ พบว่าไม่มีโมโนเมอร์ R3HB เหลืออยู่ภายในเซลล์ นำเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ภายหลังดีพอลิเมอไรเซชันไปตรวจหา PHB พบว่าที่ค่า pH เท่ากับ 4.0 มีปริมาณ PHB มากที่สุดเท่ากับ 1.10 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 29.64 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และที่ค่า pH เท่ากับ 5.5 มีปริมาณ PHB น้อยที่สุดเท่ากับ 0.02 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 0.55 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ได้พบว่าอะซิเตตเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากทุกตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี พบว่าที่ค่า pH เท่ากับ 4.0, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กิจกรรมจำเพาะสูงสุดของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase เท่ากับ 1.21 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อนำ *Bacillus* sp. BA-019 ไปจัดจำแนกสปีชีส์ด้วยวิธีตรวจหาลำดับ 16S rDNA เปรียบเทียบกับ GenBank พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ *Bacillus megaterium* เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

ภาควิชาจุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต.....กุสุมา กมลจรัสโสภา.....
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2547	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4472220023 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: PHB / depolymerization / R3HB / PHB depolymerase / R3HB dehydrogenase

KUSUMA KAMOLJARATSOPHA : R-(-)-3-HYDROXYBUTYRIC ACID PRODUCTION BY DEPOLYMERIZATION IN *Bacillus* sp. BA-019. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SONGSRI KULPREECHA, Ph. D., THESIS COADVISOR: ASSOC. PROF. AMORN PETSOM, Ph.D., 120 pp. ISBN 974-17-6204-6.

R-(-)-3-hydroxybutyric acid production from PHB by depolymerization in *Bacillus* sp. BA-019 was investigated. High amount of PHB was produced while cane sugar was used as C-source, urea as N-source; 4.67 g/l of DCW and 2.07 g/l of PHB or 44.40 % by DCW were obtained. PHB content was shown increased up to 2.54 g/l or 55.75 % by DCW when trace elements was increased to 2 ml/l. Monomer R3HB was produced via depolymerization of the maximum PHB-containing cells. The activity of depolymerization reaction was observed by the amount of monomer R3HB produced and was analyzed by HPLC. The optimum temperature for depolymerization was studied. Cells were suspended in sterile distilled water and reaction mixture was incubated at 30, 37 and 45°c, initial pH 7.0 without agitation (static condition). The highest amount of R3HB at the concentration of $0.36 \pm 9.47 \times 10^{-2}$ or 13.95 % by initial amount of PHB was determined at 37°c. No R3HB was detected under the agitation condition. There was no different in R3HB content obtained from the depolymerization reaction at the initial pH ranged between 2.0-10.0. When pH of reaction mixture was controlled by using buffers in the range of 4.0-9.0, the highest yield of R3HB at $1.62 \pm 5.11 \times 10^{-2}$ g/l or 94.74 % by initial PHB content was measured at the controlled pH of 5.5. No R3HB was detected when pH of the reaction mixture was controlled at 4.0. After depolymerization at controlled pH 4.0 and 5.5, residual R3HB and intracellular PHB were determined, there were no R3HB detected inside the cells. As for intracellular PHB, the highest PHB content of 1.10 g/l or 29.64 % by DCW was obtained at the controlled pH of 4.0, while the lowest amount of PHB at 0.02 g/l or 0.55 % by DCW was detected at the controlled pH of 5.5. Acetate was found to be the by-product in all samples analyzed by HPLC. The highest specific activity of R3HB dehydrogenase; 1.21 U.mg protein^{-1}, was shown under the optimum pH 4.0 and 37°c. To identify species of *Bacillus* strain BA-019, 16S rDNA, sequence method was used in comparing to those data of the GenBank. The result showed that strain BA-019 was 99% identity with that of *Bacillus megaterium* .

Department	Microbiology	Student's signature Kusuma Kamoljaratsopha
Field of study	Industrial Microbiology	Advisor's signature S. Kulpreecha
Academic year	2004	Co-advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ท่านได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำอันมีค่า และข้อคิดเห็นต่างๆ ของงานด้วยดีตลอดมา รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ศิษย์ขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบ รองศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนพี่ๆ น้องๆ และเพื่อนๆ ที่ให้กำลังใจ ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณนายปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์ และอีกหลายท่านที่ไม่ได้กล่าวถึง ที่ให้คำแนะนำที่ดี และเป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณทบวงมหาวิทยาลัยที่สนับสนุนทุนการศึกษาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้องๆ ที่ให้กำลังใจ ให้ความช่วยเหลือให้การสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญรูป..... ญ

คำย่อ..... ฑ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 วารสารปริทัศน์..... 5

3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย..... 29

4 ผลการทดลอง..... 47

5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 92

รายการอ้างอิง..... 94

ภาคผนวก.....100

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....120

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 จุลินทรีย์ที่สามารถสร้าง และสะสม PHA..... 6

2 นิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 เอสไรโบโซมัล ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BA-019..... 43

3 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase..... 46

4 การเจริญของ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ..... 49

5 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ PHB และปริมาณ PHB ของ *Bacillus* sp. BA-019..... 50

6 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ PHB และปริมาณ PHB เมื่อใช้สารละลาย trace element สูตรที่ 2 ปริมาตร 1 และ 2 มิลลิลิตรต่อลิตร 53

7 ผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันของ *Bacillus* sp. BA-019 ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0..... 56

8 ผลของการเขย่าต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน เมื่อบ่มสารผสมปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 62

9 ผลของค่า pH เริ่มต้นในช่วงเท่ากับ 2.0 – 10.0 และไม่ได้ควบคุมต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันเพื่อการผลิตโมโนเมอร์ R3HB ภายในเซลล์ของ *Bacillus* sp. BA-019..... 66

10 ผลของค่า pH ที่ควบคุมด้วยบัฟเฟอร์ ในช่วงเท่ากับ 4.0-9.0 ต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันเพื่อการผลิตโมโนเมอร์ R3HB ภายในเซลล์ของ *Bacillus* sp. BA-019..... 67

11 ความเข้มข้น และปริมาณของ PHB ของ *Bacillus* sp. BA-019 หลังการเกิดปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, pH 4.0-9.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 73

12 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase จาก *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างกัน..... 75

13 กิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase จาก *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อทำปฏิกิริยาที่ 37 องศาเซลเซียสแปรค่า pH ของบัฟเฟอร์ 4.0 - 9.0..... 77

14 ปริมาณโมโนเมอร์ R3HB ในสารผสมปฏิกิริยาที่บรรจุในขวดทดลองขนาด 2 ลิตร..... 79

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

15 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ PHB และปริมาณ PHB เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในถังหมักนาน 48 ชั่วโมง..... 81

16 ความเข้มข้นของโมโนเมอร์ R3HB ที่ได้ เมื่อบ่มสารผสมปฏิกิริยาในถังหมัก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH เท่ากับ 5.5 ด้วยกรดและด่าง อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที..... 82

17 ค่าทางสถิติของปริมาณโมโนเมอร์ R3HB เมื่อบ่มสารผสมปฏิกิริยาในน้ำที่ แปรค่าอุณหภูมิ, ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 116

17 (ต่อ) ค่าทางสถิติของปริมาณโมโนเมอร์ R3HB เมื่อบ่มสารผสมปฏิกิริยาในน้ำที่ แปรค่าอุณหภูมิ, ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 117

18 ค่าทางสถิติของปริมาณโมโนเมอร์ R3HB เมื่อบ่มสารผสมปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แปรผันค่า pH ในช่วงเท่ากับ 4.0-9.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 118

18 (ต่อ)ค่าทางสถิติของปริมาณโมโนเมอร์ R3HB เมื่อบ่มสารผสมปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แปรผันค่า pH ในช่วงเท่ากับ 4.0-9.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 119

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

1. สูตรโครงสร้างของ PHA..... 8
2. โครงสร้างผลึกของPHB..... 10
3. วิถีการสังเคราะห์และการย่อยสลาย PHB..... 12
4. โครงสร้างของกรดอาร์-(-)-3-ไฮดรอกซีคาร์บอกไซลิก..... 14
5. ตัวอย่างโมโนเมอร์ชนิดต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของ PHA..... 15
6. โครงสร้างของกรดอาร์-(-)-3-ไฮดรอกซีบิวไทริก..... 16
7. กลไกการทำงานของเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase ที่ผิวแผ่นฟิล์ม PHB..... 19
8. แบบจำลองการทำงานของเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase..... 20
9. กลไกการสร้าง PHB และการผลิตโมโนเมอร์ R3HB ใน *E. coli*..... 22
10. การผลิตโมโนเมอร์และสารในรูปเมทิลเอสเทอร์ของ R3HB โดยวิธีทางเคมี 25
11. โครงสร้างทางเคมีของ β-lactam ring..... 26
12. โครงสร้างทางเคมีของยาปฏิชีวนะในกลุ่ม carbapenem..... 27
13. โครงสร้างทางเคมีของ azetidinone..... 27
14. โครงสร้างทางเคมีของยารักษาโรคต้อหิน (glaucoma)..... 28
15. ตัวอย่างยารักษาโรคต้อหิน (glaucoma)..... 28
16. การเติบโตของ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ..... 49
17. การผลิต PHB โดยเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน..... 50
18. เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อใช้ปริมาณ trace element สูตรที่ 2 ปริมาตร 1 และ 2 มิลลิลิตร/ลิตร..... 53
19. ผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันของ *Bacillus* sp. BA-019 ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0..... 56
20. HPLC โครมาโตแกรมผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน ในการผลิตโมโนเมอร์ R3HB ที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 57

20. (ต่อ) HPLC โครมาโตแกรมผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน ในการผลิตโมโนเมอร์ R3HB ที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 58

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

21. HPLC โครมาโตแกรมเปรียบเทียบการผลิตโมโนเมอร์ R3HB ที่เกิดจากปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 59

21. (ต่อ) HPLC โครมาโตแกรมเปรียบเทียบการผลิตโมโนเมอร์ R3HB ที่เกิดจากปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 60

22. ผลของการเขย่าต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, pH เริ่มต้น 7.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.... 62

23. HPLC โครมาโตแกรมของสารผสมปฏิกิริยา เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ภาวะที่มีการเขย่าและไม่มีการเขย่า เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.... 63

23. (ต่อ) HPLC โครมาโตแกรมของสารผสมปฏิกิริยา เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ภาวะที่มีการเขย่าและไม่มีการเขย่าเป็นเวลา 72 ชั่วโมง.... 64

24. ผลของค่า pH เริ่มต้นต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน เมื่อบ่มสารผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, pH เริ่มต้นเท่ากับ 2.0-10.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 68

25. ผลของค่า pH ซึ่งควบคุมให้คงที่ด้วยบัฟเฟอร์ต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน เมื่อบ่มสารผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH เท่ากับ 4.0-9.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 68

26. HPLC โครมาโตแกรมวิเคราะห์ปริมาณโมโนเมอร์ R3HB ในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ภายหลังการเกิดปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน 70

26. (ต่อ) HPLC โครมาโตแกรมวิเคราะห์ปริมาณโมโนเมอร์ R3HB ในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ภายหลังการเกิดปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน 71

27. ปริมาณ PHB ภายในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ภายหลังปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน ที่ควบคุมค่า pH เท่ากับ 4.0-9.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 73

28. เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase จาก *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างกัน..... 75

29. เปรียบเทียบ specific activity ของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase เมื่อบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH เท่ากับ 4.0-9.0..... 77

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

30. การผลิตโมโนเมอร์ R3HB โดยเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ในขวดทดลอง ขนาด 2 ลิตร..... 79
31. ความเข้มข้นของโมโนเมอร์ R3HB เมื่อบ่มสารผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, ควบคุมค่า pH เท่ากับ 5.5 ด้วยกรดและด่าง ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 82
32. HPLC โครมาโตรแกรมของสารผสมปฏิกิริยาภายในถังหมัก..... 83
33. ผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยโปรตอน NMR ของสารมาตรฐาน กรดอาร์-(-)-3-ไฮดรอกซีบิวไทริก..... 85
34. ผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยคาร์บอน NMR ของสารมาตรฐาน กรดอาร์-(-)-3-ไฮดรอกซีบิวไทริก..... 86
35. ผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยคาร์บอน NMR A.) DEPT-90 B.) DEPT-135 ของสารมาตรฐานกรดอาร์-(-)-3-ไฮดรอกซีบิวไทริก..... 87
36. ผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยโปรตอน NMR ของสารผสมปฏิกิริยาในขวด ทดลองที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, ควบคุมค่า pH เท่ากับ 5.5 ด้วย โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 88
37. ผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยโปรตอน NMR ของสารผสมปฏิกิริยาในถังหมัก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, ควบคุมค่า pH เท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 89
38. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019..... 91

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

คำย่อ	คำอธิบาย
GC	ก๊าซโครมาโตรกราฟฟี
HPLC	ไฮเพอร์ฟอร์แมนลิควิดโครมาโตรกราฟี
R3HB	กรดอาร์-(-)-3-ไฮดรอกซีบิวไทริก
% DCW	เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
g/l	กรัมต่อลิตร
mM	มิลลิโมลาร์
h	ชั่วโมง
^{o}c	องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย