การสร้างโพลี (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรท-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรท) โดยโพลีเมอร์โดย *Alcaligenes sp.* สายพันธุ์ A-04

นางสาว อัญชนา ศูรดิษจร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

พ.ศ. 2537

ISBN 974-631-092-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FORMATION OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) COPOLYMERS BY *Alcaligenes sp.* STRAIN A-04

Miss Unchana Surathikhajon

A Thesis Submitted in Partial Fullfillment of the Requirments

for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1994

ISBN 974-631-092-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสร้างโพลี(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรท-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรท) โคโพลีเมอร์ โดย *Alcaligenes sp.* สายพันธุ์ A-04
โดย	นางสาว อัญชนา ศุรติขจร
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

บทคัดย่อและบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

อัญชนา คุรติยจร : การสร้างโพลี(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรท-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรท) โคโพลีเมอร์ โดย Alcaligenes sp. สายพันธุ์ A-04 (FORMATION OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) COPOLYMERS BY Alcaligenes sp. STRAIN A-04) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. สังคีร์ กุลปรีชา, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. อมร เพชรสม, 143 หน้า, ISBN 974-631-092-5

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง Alcaligenes sp. A-04 เพื่อสร้างและสะสม PHA (โคโพลีเมอร์ และเทอร์โพลีเมอร์) ได้แก่ อาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ คือ อาหารสูตรที่ 1 โดยเลี้ยงกล้าเชื้อเป็นเวลานาน 16 ชม. ปริมาณกล้าเชื้อที่ใช้เท่ากับ 0.6 กรัม(น้ำหนักเซลล์เปียก)/ขวด โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM เพื่อการสร้างและสะสมโคโพลีเมอร์ เป็นเวลานาน 60 ชม. ปริมาณสารอาหารหลักในอาหาร MSM ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 1.0 กรัม/ลิตร ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 0.3 กรัม/ลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.05 กรัม/ลิตร Alcaligenes sp. A-04 สามารถสร้างและสะสม PHA จากแหล่งคาร์บอนหลายชนิด ได้แก่ กรดอินทรีย์ (กรดวาเลอริก กรดบิวทิริก และกรดโพรพิโอนิค) เกลือของกรดอินทรีย์ (โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท และโซเดียมอะซีเตท) น้ำมันพืช (น้ำมันปาล์ม น้ำมันข้าวโพด น้ำมันถั่วเหลืองผสมน้ำมันเมล็ดฝ้าย และน้ำมันเมล็ดทานตะวัน) โพลีไฮดรอกซี (กลีเซอรอล) แอลกอฮอล์ (บิวทานอล และเอทธานอล) เมื่อเลี้ยง Alcaligenes sp. A-04 โดยใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.92 กรัม/ลิตร ได้โคโพลีเมอร์ปริมาณเท่ากับ 47% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง หรือ 2.31 กรัม/ลิตร โดยมี 3HV ในปริมาณ 95 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดวาเลอริก กับกรดบิวทิริก และกรดวาเลอริกกับฟรุกโตส พบว่า Alcaligenes sp. A-04 สามารถสร้างและสะสมโคโพลีเมอร์ P(3HB-3HV) สัดส่วนต่าง ๆ โดยมี 3HV ในปริมาณ 0-95 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้กรดบิวทิริก และโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท เป็นแหล่งคาร์บอนผสม พบว่า Alcaligenes sp. A-04สร้างและสะสมโคโพลีเมอร์ P(3HB-4HB) สัดส่วนต่าง ๆ โดยมี 4HB ปริมาณ 0-38 โมลเปอร์เซ็นต์ และพบว่า Alcaligenes sp. A-04 สามารถสร้างและสะสมเทอร์โพลีเมอร์ P(3HB-4HB-3HV) สัดส่วนต่าง ๆ เมื่อใช้กรดวาเลอริก กรดบิวทิริก และโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทีเรท เป็นแหล่งคาร์บอนผสม เมื่อเลี้ยง Alcaligenes sp.A-04ในถังหมักโดยควบคุมสภาวะต่าง ๆ คือ pH เท่ากับ 7.0 อุณหภูมิที่ 30°ซ อัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบ/นาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.8 vvm โดยมีปริมาณแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 20 และ 1.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ พบว่าเชื้อมีการเติบโตและสะสมโคโพลีเมอร์ได้สูงกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่า สมบัติเชิงกลของไบโอโพลีเมอร์ เช่น ค่าความเหนียว และค่าการต้านแรงดึงน้อยกว่าของปิโตรโพลีเมอร์ สมบัติทางกายภาพ และสมบัติเชิงกลของ PHA จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ เมื่อเปรียบเทียบกับโฮโมโพลีเมอร์ พบว่าโคโพลีเมอร์ และเทอร์โพลีเมอร์ที่มี 3HV และ 4HB เป็นองค์ประกอบ มีสมบัติเชิงกลที่ดีขึ้น

ภาควิชา .....จุลชีววิทยา.....
สาขาวิชา ....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....
ปีการศึกษา ..... 2537.....

ลายมือชื่อนิสิต ..... อัญชนา ศุรติยจร .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C 426107: MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: Alcaligenes sp. / POLY(-3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) / FORMATION

UNCHANA SURATHIKHAJON : FORMATION OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3(HYDROXYVALERATE) COPOLYMERS BY Alcaligenes sp. STRAIN A-04. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SONGSRI KULPREECHA, Ph.D., CO-ADVISOR : ASSIST. PROF. AMORN PETSOM, Ph.D. 143 pp.
ISBN 974-631-092-5

The optimal conditions for PHA formation and accumulation by Alcaligenes sp. A-04 are as follow ; seed culture medium : medium 1, cultivation time for seed culture:16h., inoculum size:0.6 g. (wet wt.)/flask, cultivation period for polymer formation and accumulation:60 h., amount of the major components in MSM medium : 20 g/l of carbon source, 0.1 g/l of ammonium sulfate, 1.0 g/l of KH_2PO_4, 0.3 g/l of Na_2HPO_4 and 0.05 g/l of $MgSO_4$. PHA were synthesized and accumulated by Alcaligenes sp. A-04 using various kinds of carbon-source e.g. organic acids and their salts (valeric acid, butyric acid, and propionic acid, sodium-4-hydroxybutyrate, sodium acetate) vegetable oils (palm oil, corn oil, soybean oil mixed with cotton seed oil and sunflower oil) polyhydroxy (glycerol) alcohol (butanol and ethanol). About 5 g/l of dry cell wt, 47% (by wt.) or 2.31 g/l of copolymer (contianing 95 mole% of 3HV) were of obtained when Alcaligenes sp. A-04 was cultivated using valeric acid as a carbon source. By using valeric acid and butyric acid or valeric acid and fructose as a mixed carbon sources, p(3HB-3HV) in various ratios (containing 0-95 mole% of 3HV) were accumulated by Alcaligenes sp. A-04. Copolymer of P (3HB-4HB) in various ratio (containing 0.38 mole% of 4HB) were detected when Alcaligenes sp. A-04 was cultivated using butyric acid and sodium-4-hydroxybutyrate as a mixed carbon source. Terpolymer of P(3HB-4HB-3HV) in various ratios were produced by Alcaligenes sp. A-04 while valeric acid, butyric acid and sodium-4-hydroxybutyrate was used as a mixed carbon source. Higher amount of dry cell wt. and copolymer content were obtained in 5 L. fermenter culture with controlled conditions (pH at 7.0, temperature at 30° C, agitation speed at 600 rpm, aeration rate at 1.8 vvm using 20 g/l and 1.0 g/l of carbon and nitrogen source respectively) than that of shake flask cultivation. Some mechanical properties e.g. toughness and tensile strength of biopolymer were poorer than that of petropolymer. It was found that the physical and mechanical properties of PHA were different from each other due to the composition and amount of monomer. Comparing with homopolymer, it was shown that the mechanical properties of copolymer and terpolymer containing 3HV and 4HB were better than that of homopolymer.

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต อัญชนา ศรติขจร

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือ และกรุณาอย่างยิ่งของรองศาสตราจารย์ดร. ส่งศรี กุลปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้กรุณาให้คำแนะนำให้ความช่วยเหลือในแนวคิด กำลังใจ และความเข้าใจที่มีค่ายิ่งต่อการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้คำปรึกษา การช่วยเหลือในการใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี และการวิเคราะห์สารทางเคมี อย่างดียิ่ง ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบ และรองศาตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นมานิชการ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล ผู้อำนวยการสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุ์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาในการใช้เครื่องอบแห้งภายใต้สูญญากาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. ศรัณย์ โปษยะจินดา ที่กรุณาเอื้อเฟื้อในการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเครื่อง GPC เครื่อง DSC และให้คำแนะนำที่มีค่ายิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้คำแนะนำ และช่วยเหลือด้วยดีตลอดโดยศึกษาตลอดหลักสูตรนี้

ทุนการวิจัยครั้งนี้ได้รับจากทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย จึงขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน

ขอขอบคุณ ชนัญ ผลประไพ ที่เอื้อเฟื้อให้สารผลิตภัณฑ์ P(3HB) และ อรุณ ชาญเชาว์วิวัฒน์ ที่ได้เอื้อเฟื้อสารเคมีที่จำเป็นต่อการวิจัยนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ น้องๆ และยุวดี ตาลาวนิช ที่ได้ให้กำลังใจ และให้ความช่วยเหลือแก่ข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมา

ท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ เชาวลิตร และพิศโสภา ตลอดจนสมาชิกในครอบครัวของข้าพเจ้าที่ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์นี้ตั้งแต่เริ่มต้นจนเสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญรูปภาพ..... ช

สารบัญตาราง..... ฐ

คำย่อ..... ด

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย..... 28

3 ผลการวิจัย..... 44

4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 103

รายการอ้างอิง..... 116

ภาคผนวก..... 125

ประวัติผู้เขียน..... 143

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างของโมโนเมอร์ ของ PHA	3
2	สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี IR spectrophotometry ของ PHA และ PHB	5
3	สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี NMR spectroscopy ของ PHA และ PHB .	5
4	ภาพตัดของเซลล์ *Alcaligenes eutrophus* จากกล้องจุลทรรศน์ อิเลคตรอนแสดง PHB แกรนูลภายในเซลล์	8
5	โครมาโตแกรมของอนุพันธ์เมทธิลเอสเทอร์ของกรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทิริก (1) กรดเบต้าไฮดรอกซีวาเลอริก (2) กรด-4-ออกโซวาเลอริก (3) และ กรดเบนโซอิก (4)(สารมาตรฐานภายใน)	10
6	สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{13}C NMR Spectroscopy ของโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-3HV) จาก *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ H16 ใน คลอโรฟอร์มที่ 125 MHz 27° ซ	11
7	สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{13}C NMR Spectroscopy ของโคโพลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) จาก ICI ในคลอโรฟอร์มที่ 62.9 MHz 32° ซ	12
8	สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{1}H NMR spectroscopy ของโคโพลีเมอร์ *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ H16 ในคลอโรฟอร์มที่ 500 MHz .	13
9	สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{1}H NMR spectroscopy ของโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-3HV) จาก ICI ที่ 250 MHz	13
10	สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{13}C NMR spectroscopy ของโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-3HV) จาก *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ NCIB 11599 ในคลอโรฟอร์มที่ 67.6 MHz 30° ซ	14
11	สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{1}H NMR spectroscopy ของโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-3HV) จาก *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ NCIB 11599 ในคลอโรฟอร์มที่ 500 MHz 30° ซ	14
12	สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{13}C NMR spectroscopy ของโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-4HB) จาก *Alcaligenes eutrophus* ในคลอโรฟอร์มที่ 125 MHz 27° ซ	15

รูปที่		หน้า
13	สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{1}H NMR spectroscopy ของโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-4HB) จาก *Alcaligenes eutrophus* ในคลอโรฟอร์มที่ 500 MHz 27° ซ	15
14	สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{1}H NMR spectroscopy ของเทอร์โพลีเมอร์ P(3HB-4HB-3HV)จาก *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ ATCC 17699 ในคลอโรฟอร์มที่ 500 MHz 27° ซ	16
15	วิถีการเปลี่ยน Acetyl CoA เมื่อเซลล์เจริญภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารสมดุลย์ (balance growth) และสภาวะที่สารบางอย่างถูกกำจัดแต่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ (carbon excess)	17
16	วิถีการสังเคราะห์ PHB จากกลูโคส และ P(3HB-co-3HV)จากกรดวาเลอริก ใน *Alcaligenes eutrophus*	19
17	วิถีการสังเคราะห์ P(3HB-4HB) จากกรด-4-ไฮดรอกซีบิวทิริก และกรดบิวทิริก	19
18	ปริมาณของ 3HV ในโคโพลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) ที่มีผลต่อค่า Young's modulus (stiffness) และค่า Notched izod impact (toughness)	20
19	แสดงการสร้าง PHA แบบ 1 กระบวนการแบบขั้นตอนเดียว 2 กระบวนการแบบ 2 ขั้นตอน	22
20	น้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ของ *Alcaligenes sp.* A-04 เมื่อเลี้ยงในอาหารเตรียมกล้าเชื้อสูตรที่ 1 และ 2	45
21	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์ ที่สร้างโดย *Alcaligenes sp.* A-04 ที่เวลาต่างๆ เมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน	52
22	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์ ที่สร้างโดย *Alcaligenes sp.* A-04 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อต่างกัน เป็นเวลา 60 ชม. เมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน	55
23	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลา 60 ชม. โดยแปรผันปริมาณกรดวาเลอริกเริ่มต้นในอาหาร MSM	58

รูปที่		หน้า
24	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลา 60 ชม. โดยใช้กรดวาเลอริก 20 กรัม/ลิตร และแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต	61
25	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. โดยใช้กรดวาเลอริกเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร และแปรผันปริมาณฟอสเฟต (KH_2PO_4:Na_2HPO_4) ตั้งแต่ 0:0 ถึง 4.0:1.20 กรัม/ลิตร	64
26	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. โดยใช้กรดวาเลอริกเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร ปริมาณฟอสเฟต (KH_2PO_4:Na_2HPO_4) เท่ากับ 1.0:0.30 กรัม/ลิตร และแปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตตั้งแต่ 0 ถึง 0.30 กรัม/ลิตร	67
27	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. และแปรผันความเข้มข้นทวีคูณของปริมาณกรดวาเลอริกและแอมโมเนียมซัลเฟต (20:1) โดยเพิ่มปริมาณกรดวาเลอริกสูงถึง 100 กรัม/ลิตร และจำกัดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเพียง 0.5 กรัม/ลิตร	70
28	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHA เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. ในแหล่งคาร์บอนเดี่ยวชนิดต่างๆ ที่เป็นกรดอินทรีย์ น้ำมันพืช โพลีไฮดรอกซี และแอลกอฮอล์	74
29	การเติบโต และการสร้างโคโพลีเมอร์ P(3HB-3HV) ของ *Alcaligenes sp.* A-04 เมื่อเลี้ยงในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมของกรดวาเลอริก:กรดบิวทิริก (3:2 โดยน้ำหนัก) ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1.0 กรัม/ลิตร	84
30	แผ่นฟิลม์ของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-97% 3HV) ซึ่งได้จากการเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 โดยผ่านการสกัดและทำให้บริสุทธิ์	86
31	แผ่นฟิลม์ของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-82% 3HV) ซึ่งได้จากการเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 โดยผ่านการสกัดและทำให้บริสุทธิ์	87

รูปที่ หน้า

32 แผ่นฟิลม์ของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-38% 4HB) ซึ่งได้จากการเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 โดยผ่านการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ 87

33 แผ่นฟิลม์ของสารผลิตภัณฑ์ P(48% 3HB-39% 3HV-13% 4HB) ซึ่งได้จากการเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 โดยผ่านการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ ... 88

34 แผ่นฟิลม์ของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB) ซึ่งได้จากการเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 โดยผ่านการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ 88

35 แผ่นฟิลม์ของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-14% 3HV) ของบริษัท Aldrich 89

36 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี IR spectrophotometer ของสารมาตรฐาน P(3HB-24% 3HV) ของบริษัท Aldrich 90

37 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี IR spectrophotometer ของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-97% 3HV) จากการเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 และผ่านขั้นตอนการสกัด และทำให้บริสุทธิ์ 90

38 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี IR spectrophotometer ของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-38% 4HB) จากการเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 โดยผ่านขั้นตอนการสกัด และทำให้บริสุทธิ์ 91

39 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี IR spectrophotometer ของสารผลิตภัณฑ์ P(48% 3HB-39% 3HV-43% 4HB)) จากการเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 โดยผ่านขั้นตอนการสกัด และทำให้บริสุทธิ์ 91

40 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{1}H NMR spectroscopy ของสารมาตรฐาน P(3HB-24% 3HV) 93

41 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{1}H NMR spectroscopy ของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-97% 3HV) ที่สกัดแยกได้จาก *Alcaligenes sp.* A-04 93

42 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{1}H NMR spectroscopy ของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-38% 4HB) ที่สกัดแยกได้จาก *Alcaligenes sp.* A-04 94

43 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{1}H NMR spectroscopy ของสารผลิตภัณฑ์ P(48%3HB-39%3HV-13%4HB) ที่สกัดแยกได้จาก *Alcaligenes sp.* A-04 94

44 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{13}C NMR spectroscopy ของสารมาตรฐาน P(3HB-24% 3HV) 96

รูปที่		หน้า
45	สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{13}C NMR spectroscopy ของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-97% 3HV) ที่สกัดแยกได้จาก *Alcaligenes sp.* A-04	96
46	สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{13}C NMR spectroscopy ของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-38% 4HB) ที่สกัดแยกได้จาก *Alcaligenes sp.* A-04	97
47	สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{13}C NMR spectroscopy ของสารผลิตภัณฑ์ P(48%3HB-39%3HV-13%4HB) ที่สกัดแยกได้จาก *Alcaligenes sp.* A-04	97
48	specimen สำหรับการวิเคราะหสมบัติเชิงกล	142

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปรียบเทียบคุณสมบัติทางกายภาพของ PHA และ PHB	4
2	ตัวอย่างกลุ่มและจีนัสของจุลินทรีย์ที่สะสม PHA	6
3	เปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของ PP และ PHB	21
4	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHA จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆที่สร้างโดย *Alcaligenes sp.* A-04	47
5	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHA และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 ในแหล่งคาร์บอนที่เป็นกรดอินทรีย์	49
6	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่สร้างโดย *Alcaligenes sp.* A-04 ที่เวลาต่างๆ เมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน	51
7	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่สร้างโดย *Alcaligenes sp.* A-04 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อต่างกันเป็นเวลา 60 ชม. เมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน ..	54
8	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. โดยแปรผันปริมาณกรดวาเลอริกเริ่มต้นในอาหาร MSM	57
9	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. โดยใช้ปริมาณกรดวาเลอริกเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร และแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต	60
10	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. โดยใช้กรดวาเลอริกเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร และแปรผันปริมาณแหล่งฟอสเฟต (KH_2PO_4 : Na_2HPO_4) ตั้งแต่ 0:0 ถึง 4.0:1.20 กรัม/ลิตร	63

ตารางที่ หน้า

11 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. โดยใช้กรดวาเลอริกเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร ปริมาณฟอสเฟต (KH_2PO_4:Na_2HPO_4) เท่ากับ 1.0: 0.30 กรัม/ลิตร และแปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตตั้งแต่ 0 ถึง 0.30 กรัม/ลิตร 66

12 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. และแปรผันความเข้มข้นทวีคูณของปริมาณกรดวาเลอริก และแอมโมเนียมซัลเฟต (20:1) โดยเพิ่มปริมาณกรดวาเลอริกสูงถึง 100 กรัม/ลิตร และจำกัดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเพียง 0.5 กรัม/ลิตร 69

13 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHA และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. ในแหล่งคาร์บอนเดี่ยวชนิดต่างๆ ที่เป็น กรดอินทรีย์ น้ำมันพืช โพลีไฮดรอกซีและแอลกอฮอล์ 72

14 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดวาเลอริก และกรดบิวทิริก (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร)และแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร 76

15 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดวาเลอริกและฟรุกโตส (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร) และแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร . 78

16 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดบิวทิริก และ โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวเรท (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร) และแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร 80

ตารางที่ หน้า

17 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่าง กรดวาเลอริก กรดบิวทิริก และโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวเรท (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร) และแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร 82

18 น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยและ [n] ของสารผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจาก *Alcaligenes sp.* A-04 ได้แก่ P(48% 3HB-39% 3HV-13% 4HB) P(3HB-82% 3HV) P(3HB-97% 3HV) P(3HB-38% 4HB) และ P(3HB) และสารมาตรฐาน P(3HB-14% 3HV) 98

19 อุณหภูมิหลอมเหลว (Tm) และ glass transition temperature (Tg) ของสารผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจาก *Alcaligenes sp.* A-04 ได้แก่ P(3HB) P(3HB-97% 3HV) P(48% 3HB-39% 3HV-13% 4HB) และสารมาตรฐาน P(3HB-14% 3HV) 99

20 เปรียบเทียบสมบัติเชิงกลของไบโอโพลีเมอร์ P(48%3HB-39%3HV-13%4HB) P(3HB-97%3HV) และ P(3HB) ที่ผลิตจาก *Alcaligenes sp.* A-04 และสารมาตรฐาน P(3HB-14%3HV) กับโพลีเมอร์จากปิโตรเคมี PP และ PE 102

PHA	=	โพลี-เบต้า-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (Poly-β-hydroxyalkanoate)
PHB	=	โพลี-เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทีเรท (Poly-β-hydroxybutyrate)
pH	=	ค่าความเป็นกรดด่าง
%	=	ร้อยละ
Hz	=	Hertz
cm^{-1}	=	unit of wave number (IR)
ppm	=	part per million
^{o}ซ	=	องศาเซลเซียส
ชม.	=	ชั่วโมง
มล.	=	มิลลิลิตร
มม.	=	มิลลิเมตร