การผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) โดยการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 แบบป้อนเป็นงวด ภายใต้การจำกัดปริมาณไนโตรเจน

นายอติพล บุญเรืองถาวร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-346-691-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) PRODUCTION BY FED-BATCH CULTURE OF *Bacillus* sp.BA-019 UNDER NITROGEN LIMITATION

Mr.Atipol Boonruangthavorn

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 2000
ISBN 974-346-691-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) โดยการเพาะเลี้ยง Bacillus sp.BA-019 แบบป้อนเป็นงวด ภายใต้การจำกัดปริมาณไนโตรเจน
โดย	นายอติพล บุญเรืองถาวร
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์วาสนา โตเลี้ยง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

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

.... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์วาสนา โตเลี้ยง)

.... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

.... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.เพียรพรรค ทัศคร)

อติพล บุญเรืองถาวร : การผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)โดยการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 แบบป้อนเป็นงวดภายใต้การจำกัดปริมาณไนโตรเจน. (POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) PRODUCTION BY FED-BATCH CULTURE OF *Bacillus* sp.BA-019 UNDER NITROGEN LIMITATION)
อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ส่งศรี กุลปรีชา, อ. ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์วาสนา โตเลี้ยง, 129 หน้า.
ISBN 974-346-691 -6.

การศึกษานี้เป็นการเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ และเพิ่มการผลิตโฮโมพอลิเมอร์ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ PHB ด้วยเทคนิคกระบวนการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ BA-019 เป็นสายพันธุ์ที่แยกใหม่ และจัดจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการนี้ จากสมมติฐานเมื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณของพอลิเมอร์ที่ได้โดยปริมาตรสารอาหารคงที่(ในรูปกรัมต่อลิตร)จะเพิ่มขึ้น และสิ่งที่ตามมาคือ อัตราการผลิตของพอลิเมอร์เพิ่มสูงขึ้นเวลาการเลี้ยงเชื้อจะลดลง ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเติบโต และการเพิ่มการผลิต PHB ของ *Bacillus* sp.BA-019 ได้แก่ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุ ภาวะในการเลี้ยงเชื้อที่ศึกษาได้แก่ pH อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนละลาย และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการวิจัยพบว่า *Bacillus* sp.BA-019 สามารถเติบโตพร้อมกับการผลิต PHB ได้ดี โดยใช้กากน้ำตาล และยูเรียซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูก เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้กากน้ำตาล และน้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน กากน้ำตาลให้ผลการเติบโตของเซลล์และความเข้มข้นของ PHB ดีกว่าน้ำตาลทรายเท่ากับ 2.5 และ 4.0 เท่าตามลำดับ พบว่า *Bacillus* sp.BA-019 สามารถใช้ยูเรียเพื่อการเติบโตและการผลิต PHB ได้ดีกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน การเติมกรดซิตริกโดยใช้ความเข้มข้นของกรดซิตริกที่เหมาะสมเท่ากับ 0.75 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่งผลให้เซลล์เติบโตได้เพิ่มขึ้น และทำให้ปริมาณ PHB ที่ผลิต ได้เพิ่มขึ้นด้วย แร่ธาตุในสารละลาย trace element สูตรที่ศึกษามีผลให้การเติบโตของเซลล์และการผลิต PHB เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม คือ ปริมาณกล้าเชื้อเท่ากับ 0.3 กรัมต่อลิตร pH เท่ากับ 6.0 ปริมาณออกซิเจนละลายเท่ากับ 60 % ของอากาศอิ่มตัว และใช้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 25 โมลต่อโมล ได้ศึกษาการเลี้ยงเชื้อโดยวิธี fed-batch เพื่อให้ได้ทั้งความหนาแน่นของเซลล์ และอัตราการผลิตพอลิเมอร์สูงขึ้น จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 แบบ fed-batch ที่มีการควบคุมการป้อนสารอาหารด้วยวิธี pH-stat พบว่าเมื่อใช้สารอาหารป้อนเข้าที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุ ให้ผลการเติบโตของเซลล์อย่างรวดเร็ว และมีการผลิต PHB เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน โดยผลการทดลองที่ได้ดีกว่าการใช้สารอาหารป้อนเข้าที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน หรือใช้แหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ผลการศึกษาพบว่าการใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 400 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 โมลต่อโมลในสารป้อนเข้า มีผลให้เพิ่มการผลิต PHB และความหนาแน่นของเซลล์ โดยได้ความเข้มข้นของเซลล์ปริมาณสูงขึ้นมาก (72.57 กรัมต่อลิตร) ได้ปริมาณของ PHB เท่ากับ 30.52 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็น 42 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 24 ชั่วโมง และมีอัตราการผลิต PHB เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 1.27 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ภาควิชา จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต ....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ....
ปีการศึกษา 2543	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ....

4072447923 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: PHB PRODUCTION / pH-STAT / FED-BATCH / *Bacillus* sp. / CELL DENSITY

ATIPOL BOONRUANGTHAVORN : POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) PRODUCTION BY FED-BATCH CULTURE OF *Bacillus* sp.BA-019 UNDER NITROGEN LIMITATION
THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF.SONGSRI KULPREECHA,Ph.D., THESIS COADVISOR : VASANA TOLIENG , 129 PP.ISBN 974-346-691-6

This investigation is aimed at increasing cell density and a homopolymer poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) production by *Bacillus* sp.BA-019 using cultivation process technic. The strain BA-019 was newly isolated and identified in our laboratory. Based on the hypothesis of increasing the cell density , larger amount of polymer with the fixed volume of culture broth (in term of g/l) would be obtained. Consequently, when the productivity of polymer become higher the cultivation time was shortened . The composition of culture medium e.g. carbon source , nitrogen source and trace elements affected the growth rate and the increasing PHB production. The cultivation conditions studied were pH, temperature, dissolved oxygen and C/N molar ratio of culture medium. The results showed that *Bacillus* sp.BA-019 could grow well and the PHB production was increased by using cane-molasses and urea which are inexpensive raw materials. When cane-molasses and refined cane sugar were compared ; it was shown that higher cell growth and PHB concentration was observed in cane-molasses by 2.5 and 4 folds respectively. Urea was found to support growth and PHB production as a better nitrogen source than that of $(NH_4)_2SO_4$. Supplementation with 0.75 g/l citric acid in the culture medium enhanced both growth and PHB yields. Improved formula of trace elements in this study also promoted the production of PHB compared to that of control experiment. The optimal cultivation conditions in a 5-L fermenter were as followed : inoculum size;0.3 g/l , pH;6.0 , DO;60 % of air saturation , C/N molar ratio;25. Fed-batch cultivation was performed in order to acheive both high cell density and polymer productivity. In fed-batch culture of *Bacillus* sp.BA-019 with pH-stat feeding control , cell growth and PHB production was remarkably increased when feeding solution containing a mixture of C-source, N-source and trace elements, compared to the feeding of only C-source or C and N-sources . It was exhibited that the suitable total sugar concentration at 400 g/l and C/N ratio of 10 mol/mol in feeding solution resulted in enhancing PHB production and the cell density. A larger amount of cell density (72.57 g/l) was produced with a high PHB content (30.52 g/l or equivalent to 42 % of the PHB by cell dry wt .) at 24 h and the PHB productivity was significantly increased up to 1.27 g/l-h.

Department .Microbiology……… Student's signature……
Field of study …. Industrial Microbiology… Advisor's signature……
Academic year …. 2000………………… Co-advisor's signature……

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตรจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ วาสนา โตเลี้ยง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ท่านได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำอันมีค่า และข้อคิดเห็นต่างๆของงานด้วยดีตลอดมา รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ศิษย์ขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ และ อาจารย์ ดร.เพียรพรรค ทัศคร ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนพี่ๆ และน้องๆ ที่ให้กำลังใจ ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ นายชัยชาญ ไตรศรีศิลป์ ที่ช่วยเหลือในการจัดพิมพ์วิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้อง ที่ให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.......... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.......... จ
กิตติกรรมประกาศ.......... ฉ
สารบัญ.......... ช
สารบัญตาราง.......... ซ
สารบัญรูป.......... ฎ
คำย่อ.......... ฒ

บทที่

1. บทนำ.......... 1
2. อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.......... 36
3. ผลการวิจัย.......... 47
4. สรุปผลและวิจารณ์ผลการวิจัย.......... 104

รายการอ้างอิง.......... 114
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.......... 121
ภาคผนวก ข.......... 123
ภาคผนวก ค.......... 124
ภาคผนวก ง.......... 127

ประวัติผู้เขียน.......... 129

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จุลินทรีย์ที่สะสม PHA	4
2	สมบัติบางประการทางกายภาพและความร้อนของพอลิเมอร์	11
3	เปรียบเทียบต้นทุนการผลิต PHB โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ	16
4	ผลของต้นทุนซับสเตรทและผลผลิต PHB ที่มีต่อราคา PHB	17
5	การประยุกต์ใช้ดัชนีควบคุมสำหรับกระบวนการหมักแบบ fed-batch	29
6	สรุปการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม	32
7	แสดงองค์ประกอบของ trace element สูตรต่างๆ	41
8	การเติบโตของ *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารสำหรับเตรียมกล้าเชื้อ	48
9	เปรียบเทียบการผลิต PHB ระหว่างการใช้น้ำตาลทราย 20 g/l และกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลทั้งหมด 20 g/l	50
10	ความหนาแน่นของเซลล์ ความเข้มข้นของ PHB และปริมาณ PHB เมื่อใช้ trace element ต่างกัน	52
11	ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน	54
12	ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน	55
13	ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเติมไม่มีการเติมกรดซิตริก	58
14	ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเติมกรดซิตริก 0.2 g/l	59
15	ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเติมกรดซิตริก 0.5 g/l	60
16	ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเติมกรดซิตริก 0.75 g/l	61

ตารางที่ หน้า

17 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเติมกรดซิตริก 1.0 g/l ... 62

18 เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 โดยเติมกรดซิตริกเท่ากับ 0.2-1.0 g/l และไม่เติมกรดซิตริก... 64

19 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้ความเข้มข้นกล้าเชื้อ 0.2 g/l ... 66

20 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้ความเข้มข้นกล้าเชื้อ 0.3 g/l ... 67

21 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้ความเข้มข้นกล้าเชื้อ 0.5 g/l ... 68

22 เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมักโดยแปรผันปริมาณกล้าเชื้อ... 69

23 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 โมลต่อโมล... 72

24 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 25 โมลต่อโมล... 73

25 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 50 โมลต่อโมล... 74

26 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100 โมลต่อโมล... 75

27 เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 โดยใช้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10-100 โมลต่อโมล... 77

28 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อควบคุมค่า pH เท่ากับ 6.0 ... 79

29 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อควบคุมค่า pH เท่ากับ 7.0 ... 80

ตารางที่ หน้า

30 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อควบคุมค่า pH เท่ากับ 8.0 81

31 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อไม่ควบคุมค่า pH 82

32 เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมัก เมื่อควบคุมค่า pH ต่างกัน........ 84

33 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้ปริมาณออกซิเจนละลายเท่ากับ 40 % ของอากาศอิ่มตัว........ 86

34 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้ปริมาณออกซิเจนละลายเท่ากับ 60% ของอากาศอิ่มตัว........ 87

35 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้ปริมาณออกซิเจนละลายเท่ากับ 80% ของอากาศอิ่มตัว........ 88

36 เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมัก เมื่อแปรผันปริมาณออกซิเจนละลาย........ 90

37 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 150 g/l เป็นสารป้อนเข้า........ 92

38 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 150 g/l และยูเรีย เป็นสารป้อนเข้า........ 94

39 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 150 g/l ยูเรีย และแร่ธาตุ เป็นสารป้อนเข้า........ 96

40 เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมัก เมื่อใช้อาหารป้อนเข้าต่างกัน........ 97

ตารางที่		หน้า
41	ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 400 g/l ยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 25 โมลต่อโมล) และแร่ธาตุ เป็นสารป้อนเข้า	99
42	ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 400 g/l ยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 โมลต่อโมล) และแร่ธาตุ เป็นสารป้อนเข้า	102
43	เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารป้อนเข้าต่างกัน	103
44	เปรียบเทียบการผลิต PHB โดยใช้จุลินทรีย์และเทคนิคการเพาะเลี้ยงต่างกัน	113

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างของ PHA	6
2	โครงสร้างผลึกของ PHB	10
3	วิถีการสังเคราะห์ PHB	12
4	แสดงผลของขนาดการผลิตต่อราคาของ PHB	20
5	แสดงต้นทุนด้านต่างๆเมื่อขนาดการผลิต PHB เพิ่มขึ้น	20
6	แสดงเทคนิคการป้อนสารอาหารในการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch	28
7	การเติบโตของ *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ	48
8	เปรียบเทียบการผลิต PHB ระหว่างการใช้กากน้ำตาล และน้ำตาลทราย	50
9	เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อใช้ trace element สูตรต่างกัน	52
10	การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจน	54
11	การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน	55
12	เปรียบเทียบการผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกัน	56
13	การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อไม่มีการเติมกรดซิตริก	58
14	การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อเติมกรดซิตริก 0.2 g/l	59
15	การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อเติมกรดซิตริก 0.5 g/l	60
16	การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อเติมกรดซิตริก 0.75 g/l	61
17	การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อเติมกรดซิตริก 1.0 g/l	62
18	การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมกรดซิตริกปริมาณต่างๆ	64
19	การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 0.2 g/l	66
20	การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 0.3 g/l	67
21	การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 0.5 g/l	68

รูปที่ หน้า

22 เปรียบเทียบการผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อต่างกัน 69

23 การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมัก เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 โมลต่อโมล 72

24 การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมัก เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 25 โมลต่อโมล 73

25 การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมัก เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 50 โมลต่อโมล 74

26 การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมัก เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100 โมลต่อโมล 75

27 เปรียบเทียบการผลิต PHB และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10-100 โมลต่อโมล 77

28 การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อควบคุม pH เท่ากับ 6.0 79

29 การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อควบคุม pH เท่ากับ 7.0 80

30 การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อควบคุม pH เท่ากับ 8.0 81

31 การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อไม่ควบคุม pH 82

32 เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมักโดยควบคุมค่า pH ต่างกัน 84

33 การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อควบคุมค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 40% ของอากาศอิ่มตัว 86

34 การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อควบคุมค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 60 % ของอากาศอิ่มตัว 87

35 การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อควบคุมค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 80% ของอากาศอิ่มตัว 88

36 การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักโดยแปรผันค่าออกซิเจนละลายต่างกัน 90

รูปที่ หน้า

37 การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นสารอาหารป้อนเข้า........ 92

38 การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นสารอาหารป้อนเข้า........ 94

39 การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุเป็นสารอาหารป้อนเข้า........96

40 เปรียบเทียบการผลิต PHB โดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ซึ่งมีการเติมสารอาหารต่างกัน........97

41 การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 400 g/l 99

42 เปรียบเทียบการผลิต PHB โดยการเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 แบบ fed-batch โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดต่างกัน 100

43 การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 โมลต่อโมล ในสารอาหารป้อนเข้า........ 102

44 เปรียบเทียบการผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าต่างกัน........ 103

คำย่อ

ตัวย่อ	คำอธิบาย
g/l	กรัมต่อลิตร
g/l-h	กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง
% by wt.	เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
PHB	พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต
h	ชั่วโมง
μ	อัตราการเติบโตจำเพาะ