การใช้น้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต โดย *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347

นางสาวภัทรพร มัตติกามัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-331-552-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CRUDE PALM OIL AS A CARBON SOURCE FOR THE PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES BY *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347

Miss Pattaraporn Mattikamai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Program of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1998

ISBN 974-331-552-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้น้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต โดย *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347
โดย	นางสาวภัทรพร มัตติกามัย
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.โสภณ เริงสำราญ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยพร ณ นคร

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. โสภณ เริงสำราญ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยพร ณ นคร)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิชัย เชิดชีวศาสตร์)

ภัทรพร มัตติกามัย : การใช้น้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอน ในการผลิตโพลีไฮดรอกซี-อัลคาโนเอต โดย *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 (CRUDE PALM OIL AS A CARBON SOURCE FOR THE PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES BY *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.โสภณ เริงสำราญ อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.ปิยพร ณ นคร ; 79 หน้า. ISBN 974-331-552-7.

เลี้ยงแบคทีเรีย *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 โดยใช้น้ำมันปาล์มดิบตามธรรมชาติ และน้ำมันปาล์มดิบที่ผ่านการสะพอนิฟาย ปรับค่าพีเอช 7 และ 8 เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อในภาวะที่สร้างโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHA) เมื่อเปรียบเทียบการเจริญพบว่า น้ำมันปาล์มดิบที่ผ่านการสะพอนิฟาย พีเอช 7 ทำให้แบคทีเรียเจริญดีที่สุด และสามารถสร้าง PHA โดยมีการสร้างสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 จำนวน 23 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 4.97 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จากการหาโครงสร้างโดยใช้ นิวเคลียร์ แมกเนติก เรโซแนนซ์ และแก๊สโครมาโตกราฟี-แมส สเปกโทรเมตรี แสดงให้เห็นว่า PHA จากน้ำมันปาล์มดิบที่ผ่านการสะพอนิฟายเป็นโคโพลีเมอร์ที่มีหน่วยโครงสร้างส่วนใหญ่เป็นไฮดรอกซี-เฮกซะดีคาโนเอต (C_{16}) ร้อยละ 67 และไฮดรอกซีออกตะดีคาโนเอต (C_{18}) ร้อยละ 20

ภาควิชา - ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

#3971295123 MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: POLYHYDROXYALKANOATES / PHA / CRUDE PALM OIL / *Pseudomonas oleovorans*
PATTARAPORN MATTIKAMAI : CRUDE PALM OIL AS A CARBON SOURCE FOR THE PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES BY *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SOPHON ROENGSUMRAN, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSIST. PROF. BYAPORN NA NAGARA, Ph.D., 79 pp. ISBN 974-331-552-7.

Pseudomonas oleovorans ATCC 29347 was grown in media containing crude palm oil and saponified crude palm oil (pH 7 and 8) as the sole carbon sources under nutrient- limiting conditions. Using saponified crude palm oil pH 7 *P. oleovorans* could produce the highest yield of cells and accumulated PHA, yielding PHA content of 4.97% of their cells dry weights. Extracts from 12 hours culture were found to have a higher PHA yield. NMR spectrum and GC-MS showed that these polymer from saponified crude palm oil were copolymers consisting mainly of hydroxyhexadecanoate (C_{16}) and hydroxycotadecanoate (C_{18})

ภาควิชา - ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.โสภณ เริงสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยพร ณ นคร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ท่านทำให้งานวิจัยนี้เกิดขึ้น ตลอดระยะเวลาการวิจัย ท่านให้ความรู้ คำแนะนำ แนวคิดต่างๆที่มีประโยชน์ และให้กำลังใจอยู่เสมอ กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.วิชัย เชิดชีวศาสตร์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ท่านกรุณาสละเวลาอันมีค่าให้คำแนะนำต่างๆ จนงานวิจัยนี้สมบูรณ์ ขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. วินัย ดะห์ลัน คุณปรีดา พงษ์เฉลิม คุณพัสตรา สมบูรณ์ธเนศ สำหรับความเอื้อเฟื้อวัตถุดิบ เครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นในการทำงานวิจัยนี้ ขอบพระคุณอาจารย์สุริยพงศ์ กุลกีรติยุต ที่กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในหลายๆด้าน ขอบพระคุณภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะสหเวชศาสตร์ สำหรับสถานที่ทำงานวิจัย ขอบพระคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ในหลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพทุกท่าน ขอบคุณความมีน้ำใจและกำลังใจจากเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ทุกคน ที่ช่วยให้งานสำเร็จลุล่วง สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ สำหรับความรัก ความเข้าใจและความปรารถนาดีอย่างหาที่เปรียบมิได้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญรูป ..... ญ
คำย่อ ..... ฏ
บทที่
1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ 3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 4
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 4
1.5 ขั้นตอนของการวิจัย 4
2 ทฤษฎี แนวคิด และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5
2.1 โพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต 5
2.2 PHA และ PHB 8
2.3 ประโยชน์ของ PHA 8
2.4 Pseudomonads กับการสร้าง PHA 10
2.5 กลไกการสร้าง PHA ใน Pseudomonads 11
2.6 การสร้าง PHA ใน *Pseudomonas oleovorans* 14
2.7 การผลิตPHA โดยใช้กรดไขมันสายยาวใน Pseudomonads 15
2.8 น้ำมันปาล์มดิบ 20
3 วิธีดำเนินการวิจัย 24
3.1 ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์ 24
3.2 จุลินทรีย์ 26
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 26

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่

3 วิธีดำเนินการวิจัย (ต่อ)

3.4 วิธีการเก็บรักษาและการเลี้ยงจุลินทรีย์ 29

3.5 การติดตามการเจริญของเชื้อ 30

3.6 การตรวจดูการสะสมของ PHA ในเซลล์แบคทีเรีย 30

3.7 การศึกษาลักษณะเซลล์แบคทีเรียโดยการย้อมสีแกรม 31

3.8 การหาปริมาณ PHA 31

3.9 การสกัด PHA จากเซลล์แบคทีเรีย 31

3.10 การวิเคราะห์โพลีเมอร์ 32

4 ผลการทดลอง 34

4.1 ผลการเปรียบเทียบการเจริญของ *P. oleovorans* ในอาหารเหลวเพื่อการผลิต PHA ที่มีแหล่งคาร์บอนจากน้ำมันปาล์มดิบรูปแบบต่าง ๆ 34

4.2 ผลการศึกษาลักษณะเซลล์แบคทีเรียจากการย้อมสีแกรม 37

4.3 ผลการตรวจดูการสะสม PHA ในเซลล์แบคทีเรีย 40

4.4 ผลการหาปริมาณ PHA ที่แบคทีเรียผลิตระหว่างการเจริญ 41

4.5 ผลการวิเคราะห์โพลีเมอร์จาก *P. oleovorans* 41

5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 51

5.1 สรุปผลการทดลอง 51

5.2 วิจารณ์ผลการทดลอง 52

รายการอ้างอิง 57

ภาคผนวก 63

ประวัติผู้วิจัย 79

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

2-1 แสดงการแบ่งกลุ่มและตัวอย่างของ PHA 6

2-2 แสดงสกุลของแบคทีเรียที่สะสม PHA 7

2-3 แสดงการเปรียบเทียบสมบัติของโพลีเมอร์ชนิดต่าง ๆ 9

2-4 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของ PHA จาก Pseudomonads 10

2-5 คุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของน้ำมันปาล์ม 22

2-6 ส่วนประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปาล์ม 23

4-1 แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของ *P. oleovorans* ในแหล่งคาร์บอนจากน้ำมันปาล์มดิบรูปแบบต่าง ๆ 35

4-2 แสดงผลการวิเคราะห์สัดส่วนโพลีเมอร์โดย แก๊สโครมาโตกราฟี–แมส สเปคโตรเมทรี 49

5-1 การผลิต PHA จากแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ของ *P. oleovorans* ในระดับขวดเขย่า 54

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1-1	วัฏจักรของโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	2
2-1	สูตรโครงสร้างทั่วไปของ PHA	5
2-2	ความสัมพันธ์ระหว่างเมทาบอลิซึมของกรดไขมันกับการสร้าง PHA ใน Pseudomonads	11
2-3	แสดงวิถีการสร้าง PHA ในกลุ่ม Pseudomonads	12
2-4	แสดงการสร้าง PHA ใน P. oleovorans จากอะเซทิลโคเอนไซม์-เอ	13
2-5	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แสดงกรานูลของPHAในเซลล์ของ *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 เมื่อเลี้ยงใน นอร์มัลออกเทน 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	15
2-6	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แสดงกรานูลของPHAในเซลล์ของ *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 เมื่อเลี้ยงใน ออกทีน (1-octene) 50 เปอร์เซ็นต์	16
2-7	แสดง *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ที่สะสม PHA ปริมาณร้อยละ 20-25 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด	18
2-8	แสดงกรานูลของ PHA ที่แยกจาก *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 เมื่อนำไปแช่แข็ง (freeze-fractured) เกิดการยืดตัวออกคล้ายดอกเห็ด	18
2-9	แสดงส่วนประกอบของผลปาล์ม	20
2-10	น้ำมันปาล์มดิบ	21
4-1	การเจริญของ *P. oleovorans* ในอาหารเพื่อการผลิต PHA เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำมันปาล์มรูปแบบต่าง ๆ	36
4-2	แสดงลักษณะเซลล์ของแบคทีเรีย *P. oleovorans* จากการย้อมสีแกรม เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHA โดยใช้ SCPO 2 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 4 ชั่วโมง	37
4-3	แสดงลักษณะเซลล์ของแบคทีเรีย *P. oleovorans* จากการย้อมสีแกรม เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHA โดยใช้ SCPO 2 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 14 ชั่วโมง	38

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่

4-4 แสดงลักษณะเซลล์ของแบคทีเรีย *P. oleovorans* จากการย้อมสีแกรม เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHA โดยใช้ SCPO 2 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 40 ชั่วโมง 39

4-5 แสดงลักษณะกรานูลของ PHA ในเซลล์ของ *P. oleovorans* จากการย้อมสี ไนล์ บลู เอ เมื่อใช้ SCPO 2 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเป็นเวลา 14 ชั่วโมง ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ 40

4-6 แสดงปริมาณ PHA ที่ *P. oleovorans* ผลิตในระหว่างการเจริญเมื่อใช้ SCPO 2 มิลลิโมลาร์เป็นแหล่งคาร์บอน 42

4-7 แสดงสูตรโครงสร้างของ PHA จาก *P. oleovorans* เมื่อเลี้ยงโดยใช้ SCPO เป็นแหล่งคาร์บอน 43

4-8 ^{1}H -NMR สเปกตรัมของโพลีเมอร์ จากการเลี้ยง *P. oleovorans* โดยใช้ SCPO เป็นแหล่งคาร์บอน 44

4-9 ^{1}H -NMR สเปกตรัมของโพลีเมอร์ จากการเลี้ยง *P. oleovorans* โดยใช้ SCPO เป็นแหล่งคาร์บอน (ต่อ) 45

4-10 ^{1}H -NMR สเปกตรัมของโพลีเมอร์ จากการเลี้ยง *P. oleovorans* โดยใช้ SCPO เป็นแหล่งคาร์บอน (ต่อ) 46

4-11 ^{13}C - NMR สเปกตรัมของโพลีเมอร์ จากการเลี้ยง *P. oleovorans* โดยใช้ SCPO เป็นแหล่งคาร์บอน 47

4-12 ^{13}C - NMR สเปกตรัมของโพลีเมอร์ จากการเลี้ยง *P. oleovorans* โดยใช้ SCPO เป็นแหล่งคาร์บอน (ต่อ) 48

4-13 อินฟราเรด สเปกตรัม ของโพลีเมอร์จาก *P. oleovorans* เมื่อใช้ SCPO ปริมาณ 2 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน 50

คำย่อ

^{o}ซ	=	องศาเซลเซียส
ATCC	=	American Type Culture Collection
CFU	=	จำนวนโคโลนี (Colony Forming Unit)
CPO	=	น้ำมันปาล์มดิบ (Crude palm oil)
^{13}C	=	คาร์บอน 13
cm	=	เซนติเมตร
FT-IR	=	ฟูริเออร์ ทรานสฟอร์ม อินฟราเรด (Fourier Transform Infrared)
FSC	=	Functional group in side chain
g	=	กรัม
Hrs	=	ชั่วโมง
^{1}H	=	โปรตอน
L	=	ลิตร
LCL	=	Long chain length
mL	=	มิลลิลิตร
mM	=	มิลลิโมลาร์
NMR	=	นิวเคลียร์ แมกเนติก เรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance)
P.	=	*Pseudomonas*
pH	=	ค่าพี เอช
PHA	=	โพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates)
PHB	=	โพลีไฮดรอกซีบิวทีเรต (polyhydroxybutyrate)
PHO	=	โพลีไฮดรอกซีออกตะโนเอต (polyhydroxyoctanoate)
SCL	=	Short chain length
SCPO	=	Saponified Crude Palm oil