ผลของซับสเตรตต่อสัดส่วนของ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตใน พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ซึ่งผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019

นางสาว สุดา สุภาชวินสวัสดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-333-846-2

ลิขสิทธิ์ของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF SUBSTRATES ON THE 3-HYDROXYVALERATE MOLE FRACTION IN POLY (3-HYDROXYBUTYRATE-*CO*-3-HYDROXYVALERATE) PRODUCED BY *Bacillus* sp. BA-019

Miss Suda Supachavinswad

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 1999

ISBN 974-333-846-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของซับสเตรตต่อสัดส่วนของ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตใน พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ซึ่งผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019
โดย	นางสาว สุดา สุภาชวินสวัสดิ์
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

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

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม)

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

สุดา สุภาชวินสวัสดิ์ : ผลของซับสเตรตต่อสัดส่วนของ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตในพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ซึ่งผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019 (EFFECT OF SUBSTRATES ON THE 3-HYDROXYVALERATE MOLE FRACTION IN POLY (3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) PRODUCED BY *Bacillus* sp. BA-019)
อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สงศรี กุลปรีชา ; 136 หน้า. ISBN 974-333-846-2

จากการศึกษาพบว่า *Bacillus* sp. BA-019 ใช้น้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อได้ดีกว่าการใช้ฟรักโตส การใช้แหล่งคาร์บอนเดี่ยวเป็นซับสเตรตเพื่อผลิตเฮทเทอร์โรพอลิเมอร์ พบว่า ซับสเตรตประเภทเกลือของกรดอินทรีย์และน้ำตาลใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยวเพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)ได้ แต่ได้สัดส่วนของ3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตต่ำ ส่วนกลุ่มของน้ำมันพืชและแอลกอฮอล์ไม่สามารถใช้เป็นซับสเตรตได้ ซับสเตรตประเภทแหล่งไนโตรเจนไม่มีผลต่อการเพิ่มสัดส่วนของ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต แต่พบว่ายูเรียทำให้เชื้อผลิตโคพอลิเมอร์ได้ปริมาณสูงกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์และสารสกัดจากยีสต์ ภาวะในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเริ่มต้นที่ 7.5 - 8.5 ทำให้ได้สัดส่วนของ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตเท่ากับ 7 - 9 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่านี้ และปริมาณอากาศที่เหมาะสม คือ ปริมาณอากาศระดับปานกลางในขวดเขย่า พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 ผลิต 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตสัดส่วนสูงที่สุดได้เท่ากับ 65 โมลเปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 72 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้โซเดียมวาเลอเรตปริมาณ 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตรร่วมกับโซเดียมวาเลอเรต 5 กรัมต่อลิตร พบว่า เชื้อนี้ผลิตได้สัดส่วนของ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตสูงเท่ากับ 22 โมลเปอร์เซ็นต์ที่ 48 ชั่วโมง และเพิ่มเป็น 26 โมลเปอร์เซ็นต์เมื่อเลี้ยงเชื้อนานขึ้นเป็น 60 ชั่วโมง และได้โคพอลิเมอร์ปริมาณสูงด้วยเท่ากับ 35.18 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลแห้ง ซับสเตรตที่ใช้ได้ดีรองลงมา ได้แก่ แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตรกับโซเดียมโพรพิโอเนต 5 กรัมต่อลิตร โดยพบว่าเชื้อผลิต 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตได้เท่ากับ 20 โมลเปอร์เซ็นต์ และได้ปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ 32.18 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 500 มีผลทำให้ *Bacillus* sp. BA-019 ผลิต 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตได้สัดส่วนที่สูงเท่ากับ 24 โมลเปอร์เซ็นต์ซึ่งสูงกว่าที่อัตราส่วนอื่น รวมทั้งได้ปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ 50.44 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งซึ่งสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ การจำกัดปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อสัดส่วนของ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตในโคพอลิเมอร์ แต่การจำกัดโพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตพบว่า ไม่มีผลต่อการเพิ่มหรือลดสัดส่วนของ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต ผลการเติมซับสเตรตประเภทซับพลีเมนต์พบว่า เมทไธโอนีนเป็นกรดอะมิโนชนิดเดียวที่มีผลให้สัดส่วน 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตสูงกว่าชุดที่ไม่เติมและชุดที่เติมกรดอะมิโนชนิดอื่น ส่วนการเติมโซเดียมซิเตรตมีผลให้การผลิต 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตได้ต่ำเพียง 7 โมลเปอร์เซ็นต์ แต่มีผลทำให้ปริมาณโคพอลิเมอร์พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) เพิ่มขึ้นสูงที่สุดเท่ากับ 55.35 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

ภาควิชาจุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2542

SUDA SUPACHAVINSWAD : EFFECT OF SUBSTRATES ON THE 3-HYDROXYVALERATE MOLE FRACTION IN POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) PRODUCED BY *Bacillus* sp. BA-019.
THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SONGSRI KULPREECHA, Ph.D. 136 pp. ISBN 974-333-846-2 .

It was found that 10 g/l of refined cane sugar was more suitable to use as carbon-source than that of fructose in seed culture medium of *Bacillus* sp. BA-019. The result of utilization of single carbon source for heteropolymer production, showed that salts of some organic acid and sugars were assimilated as single carbon for producing the poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) [PHBV] with a low mole % of 3-hydroxyvalerate [3HV]. Vegetable oil and alcohol were not utilized as single carbon substrate. Nitrogen sources had no effect on 3HV mole fraction but the amount of copolymer PHBV was increased in the medium containing urea than that of $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl or yeast extract. The initial pH of production medium and amount of air in culture broth showed some effect on 3HV production, i.e. 7-9 mole % of 3HV was obtained at pH between 7.5 - 8.5 more than that of the lower pH values. Moderate levels of air in shaked flask culture resulted in higher mole fraction of 3HV than at lower or higher level of air in the culture broth. *Bacillus* sp. BA-019 was capable of producing 3HV as high as 65 mole % at 72 h. of cultivation in medium containing 20 g/l of sodium valerate as single carbon substrate. In the mixed carbon source of 15 g/l of refined cane sugar and 5 g/l of sodium valerate, 22 mole % of 3HV was produced at 48 h and increased to 26 mole % at 60 h., and the high amount (35.18 % by dry cell weight) of PHBV was also obtained. The mixed carbon source of 15g/l refined cane sugar and 5g/l sodium propionate were also found suitable for PHBV production by *Bacillus* sp. BA-019, as 20 mole % of 3HV and 32.18 % by dry cell weight of copolymer PHBV were detected. C/N ratio of 500 (mole/mole) enhanced 3HV production by *Bacillus* sp. BA-019 as indicated from the highest amount of 3HV (24 mole %). The amount of PHBV was also increased remarkably up to 50.44 % by dry cell weight. It was shown that limitation of $MgSO_4$ had effect on 3HV mole fraction but KH_2PO_4 had no effect. Supplementation of methionine showed higher 3HV mole fraction than without addition or addition of other amino acids. The supplementation of sodium citrate decreased 3HV mole fraction (7 mole %) but significantly increased PHBV content up to 55.35 % by dry cell weight

ภาควิชาจุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2542

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ท่านได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำอันมีค่า และข้อคิดเห็นต่างๆ ของงานด้วยดีตลอดมา รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ศิษย์ขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ของภาควิชาชีววิทยา ตลอดจนพี่ๆ และน้องๆ ที่ให้กำลังใจ ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยด้วยดีตลอดมา

งานวิจัยนี้ส่วนหนึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย และบางส่วนจากทุนของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ดังนั้นจึงขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยและคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้อง ที่ให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		จ
กิตติกรรมประกาศ		ฉ
สารบัญ		ช
สารบัญตาราง		ฌ
สารบัญรูป		ฒ
คำย่อ		ต
บทที่		
1	บทนำ	1
	พลาสติกที่ย่อยสลายได้	2
	พอลิเมอร์ย่อยสลายทางชีวภาพ	3
	พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHA)	4
	พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [PHBV]	10
	วิถีการสังเคราะห์ PHA	13
	การผลิตโคพอลิเมอร์ของ PHBV โดยควบคุมสัดส่วนของ 3HV	18
	แนวทางการนำ PHA ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์	23
	มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย	25
	วัตถุประสงค์	26
	ขั้นตอนการวิจัย	26
2	อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	27
	อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์	27
	จุลินทรีย์	31
	อาหารเลี้ยงเชื้อ	31
	วิธีการเก็บรักษาเชื้อและเตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ	32
	วิธีการวิเคราะห์	33

บทที่		หน้า
3	ผลการทดลอง	43
	การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีของ *Bacillus* sp. BA-019	43
	การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ	46
	ผลของแหล่งคาร์บอนเดี่ยวชนิดต่างๆ ต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ และปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019	49
	ผลของซับสเตรตต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019	57
	ภาวะในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ที่มีผลต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV	71
	ผลของคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีต่อการเพิ่มสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV	76
	ผลของแร่ธาตุที่สำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV	90
	ผลของซับพลีเมนต์ (supplement) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณ PHBV	94
	ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus* sp. BA-019 ที่สะสม PHA เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	99
	การสกัดโคพอลิเมอร์	101
4	สรุปผลและวิจารณ์ผลการวิจัย	102
รายการอ้างอิง		113
ภาคผนวก		124
ประวัติผู้วิจัย		136

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จุลินทรีย์ที่สะสม PHA	7
2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี ของ *Bacillus* sp. BA-019 เปรียบเทียบกับ *Bacillus megaterium*	44
3	การเติบโตของ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อที่มีฟรักโตส กลูโคส ซูโครส หรือน้ำตาลทราย (10 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอน	47
4(ก)	ปริมาณพอลิเมอร์ ชนิดและสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิต ที่ใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว	51
4(ข)	ปริมาณพอลิเมอร์ ชนิดและสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิต ที่ใช้แอลกอฮอล์เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว.	51
4(ค)	ปริมาณพอลิเมอร์ ชนิดและสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิต ที่ใช้เกลือของกรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว	53
4(ง)	ปริมาณพอลิเมอร์ ชนิดและสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิต ที่ใช้น้ำตาล 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว	53
4(จ)	ปริมาณพอลิเมอร์ ชนิดและสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิต ที่ใช้น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว	54
5	การผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดย *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับการผลิตที่ใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทรายและกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ	58
6	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วนของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทรายกับกรดโพรพิโอนิก	60
7	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วนของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทรายกับกรดวาเลอริก	60

ตารางที่		หน้า
8	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วนของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทรายกับโซเดียมโพรพิโอเนต	62
9	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วนของ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 0.1 ถึง 3.0 กรัมต่อลิตร	64
10	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วนของ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมคลอไรด์ปริมาณ 0.08 ถึง 2.4 กรัมต่อลิตร	66
11	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วนของ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 0.18 ถึง 5.53 กรัมต่อลิตร	68
12	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วนของ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นยูเรียปริมาณ 0.05 ถึง 1.36 กรัมต่อลิตร	69
13	น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV และค่า pH เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 เพื่อการผลิต PHBV โดยแปรผันค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6 ถึง 8.5	72
14	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ที่เปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนระหว่างแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย โดยปรับที่ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 7.5	73
15	น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อให้ปริมาณอากาศแตกต่างกัน โดยใช้ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตั้งแต่ 25 ถึง 100 มิลลิลิตร	75
16(ก)	น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้โซเดียมโพรพิโอเนตหรือโซเดียมวาเลอเรต อย่างใดอย่างหนึ่ง ปริมาณ 5 ถึง 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน	77
16(ข)	น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วน 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้โซเดียมวาเลอเรต 20 ถึง 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน	78

ตารางที่		หน้า
17	น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่า pH สัดส่วนของ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBVที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ที่มีเกลือวาเลอเรต 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	80
18(ก)	น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นโซเดียมโพรพิโอเนต 5 หรือโซเดียมวาเลอเรต 5 และน้ำตาลทราย 5 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตร.....	83
18(ข)	น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นโซเดียมโพรพิโอเนต 10 หรือโซเดียมวาเลอเรต 10 และน้ำตาลทราย 5 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตร.....	84
19	น้ำหนักเซลล์แห้ง pH สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBVที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ที่มีน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตรและโซเดียมวาเลอเรต 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	86
20	น้ำหนักเซลล์แห้ง pH สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคาร์บอนต่อไนโตรเจน ตั้งแต่ 10 ถึง 200 โมลต่อโมล และไม่เติมไนโตรเจน.....	89
21	น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBVที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ที่แมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณ 0 ถึง 0.4	91
22	น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBVที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อมีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ปริมาณ 0 ถึง 5 กรัมต่อลิตร.....	92
23	น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBVที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์บางชนิดปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร.....	95
24	น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBVที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ที่เติมกรดอะมิโนบางชนิดลงไป 50 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	98

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	วัฏจักรของ PHA	5
2	สูตรโครงสร้างของ PHA	8
3	สูตรโครงสร้างโมเลกุลของ PHBV	10
4	วิถีการสังเคราะห์ของ PHB	14
5	วิถีการสังเคราะห์ของโคพอลิเอสเทอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยของ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต และ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต	15
6	วิถีการสังเคราะห์ PHA ใน *Ralstonia eutropha* ยกเว้นวิถี VII จาก *Alcaligenes* AK 201	16
7	วิถีการสังเคราะห์ PHB และ PHBV ใน *Azotobacter salinestris*	17
8	ชุดสกัด Soxhlet apparatus	42
9(ก)	รูปย้อมสีแกรมของเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 อายุ 18 ชั่วโมง เลี้ยงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ	45
9(ข)	รูปแสดงการสร้างแกรนูลและการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. BA-019 อายุ 18 ชั่วโมง เลี้ยงบนอาหารแข็งนิวเตรียนต์	45
10	การเติบโตของ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อที่มีฟรักโตส กลูโคส ซูโครส หรือน้ำตาลทราย (10 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอน	48
11(ก)	เปรียบเทียบปริมาณเฮทเทอร์โรพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้เกลือของกรดอินทรีย์ น้ำมันพืชและแอลกอฮอล์เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว	55
11(ข)	เปรียบเทียบปริมาณเฮทเทอร์โรพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้น้ำตาลและพอลิไฮดรอกซีแอลกอฮอล์เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว	55
12	เปรียบเทียบปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในน้ำตาลทรายกับกรดอินทรีย์บางชนิด	59
13	เปรียบเทียบปริมาณและสัดส่วนโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในน้ำตาลทรายกับกรดโพรพิโอนิก กรดวาเลอริกและเกลือโพรพิโอเนต	62
14	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วน PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 ถึง 3 กรัมต่อลิตร	65
15	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วน PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0.08 ถึง 2.4 กรัมต่อลิตร	66

รูปที่		หน้า
16	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วน PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในสารสกัดจากยีสต์ เท่ากับ 0.18 ถึง 5.53 กรัมต่อลิตร	68
17	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณและสัดส่วน PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในยูเรีย เท่ากับ 0.18 ถึง 5.53 กรัมต่อลิตร	69
18	เปรียบเทียบปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ในแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ	70
19	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งสัดส่วนของ 3HV และปริมาณ PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ที่ pH ต่างๆ	72
20	เปรียบเทียบการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง Bacillus sp. BA-019 ที่ภาวะการให้อากาศปริมาณต่างๆ	75
21	เปรียบเทียบปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในโซเดียมโพรพิโอเนตและโซเดียมวาเลอเรตปริมาณต่างๆ	77
22	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งปริมาณและสัดส่วนโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในโซเดียมวาเลอเรตปริมาณต่างๆ	79
23	น้ำหนักเซลล์แห้ง pH สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับการผลิตที่มีโซเดียมวาเลอเรต 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน	81
24	(ก) สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และ (ข) ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับการผลิตที่ใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างโซเดียมโพรพิโอเนตหรือโซเดียมวาเลอเรตกับน้ำตาลทรายปริมาณต่างๆ	85
25	น้ำหนักเซลล์แห้ง pH สัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตรและโซเดียมวาเลอเรต 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน	87
26	เปรียบเทียบปริมาณและสัดส่วนโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างกัน	89
27	เปรียบเทียบปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV และสัดส่วนของ 3HV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตต่างกัน	91
28	เปรียบเทียบปริมาณและสัดส่วนโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณโพแทสเซียมต่างกัน	93

รูปที่		หน้า
29	เปรียบเทียบสัดส่วนและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารที่เติมเกลือของกรดบางชนิด 1 กรัมต่อลิตร	95
30	น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่า pH สัดส่วนของ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารที่เติมโซเดียมซิเตรต	96
31	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารที่เติมเกลือของกรดอะมิโน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร	98
32	เซลล์ของ *Bacillus* sp. BA-019 ที่แสดงลักษณะแกรนูลที่สะสมพอลิเมอร์ จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตนาน 48 ชั่วโมง ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	100
33	ลักษณะพอลิเมอร์โฮโมพอลิเมอร์ PHB และโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์ต่างๆกัน	101
34	กราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Bacillus* BA-019	128
35	กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณซูโครส ด้วยวิธี HPLC	129
36	กราฟมาตรฐานโมโนเมอร์ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต	129
37	กราฟมาตรฐานโมโนเมอร์ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต	130
38	กราฟมาตรฐานของยูเรีย	130
39	กราฟมาตรฐานของแอมโมเนียม-ไนโตรเจน	131
40	กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณซูโครส หาด้วยวิธี DNSA	131
41	โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3HB)	132
42	โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 3-ไฮดรอกวาเลอเรต (3HV)	132
43	โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 2-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (2HB)	133
44	โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (4HB)	133
45	ตัวอย่างโครมาโตแกรมของโคพอลิเมอร์ PHBV ซึ่งผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยโซเดียมวาเลอเรต 20 กรัมต่อลิตร (ที่เวลา 60 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ วิเคราะห์ด้วยวิธี GC	134
46	ตัวอย่างโครมาโตแกรมของโคพอลิเมอร์ PHBV ซึ่งผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมอะซิเตต 1 กรัมต่อลิตรเป็นซับพลีเมนต์	134
47	โครมาโตแกรมของน้ำตาล ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC	135

คำย่อ

คำย่อ	คำอธิบาย
% / นน.	เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
GC	ก๊าซโครมาโตกราฟฟี (gas chromatography)
pH	ค่าความเป็นกรดด่าง
PHA	พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates)
PHB	พอลิ-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (Poly-3-hydroxybutyrate)
PHBV	พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) (Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate))
ก/ล	กรัมต่อลิตร
มล.	มิลลิลิตร
มก.	มิลลิกรัม