175685

อดิพล 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 จากสมมติฐาน เมื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ 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
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2543

ลายมือชื่อนิสิต ....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ....

175685

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..........................