T 162546

นางสาวกุสุมา กมลจรัสโสภา : การผลิตกรดอาร์-(-)-3-ไฮดรอกซีบิวไทริกโดยการดีพอลิเมอไรเซชันในเซลล์ของ *Bacillus* sp. BA-019. (R-(-)-3-HYDROXYBUTYRIC ACID PRODUCTION BY DEPOLYMERIZATION IN *Bacillus* sp. BA-019) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ส่งศรี กุลปรีชา, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.อมร เพชรสม จำนวนหน้า 120 หน้า. ISBN 974-17-6204-6.

การศึกษาการผลิตกรดอาร์-(-)-3-ไฮดรอกซีบิวไทริกจาก PHB โดยปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 พบว่าเซลล์สามารถผลิต PHB ได้ปริมาณมาก เมื่อใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.67 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 2.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 44.40 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อมีการเพิ่มปริมาณสารละลาย trace element เป็น 2 มิลลิลิตรต่อลิตร พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.55 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้น PHB เพิ่มขึ้นเป็น 2.54 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 55.75 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นนำเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ที่มีการสะสม PHB สูงที่สุดไปทำปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน ซึ่งตรวจหากิจกรรมของปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันนี้จากปริมาณโมโนเมอร์ R3HB ที่ได้ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสำหรับปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน โดยเมื่อนำเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ไปกระจายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ บ่มสารผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส, ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ในภาวะที่ไม่มีการเขย่า พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เซลล์สามารถผลิตโมโนเมอร์ R3HB ได้สูงสุด มีความเข้มข้นเท่ากับ $0.36 \pm 9.47 \times 10^{-2}$ กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณโมโนเมอร์ R3HB เท่ากับ 13.95 เปอร์เซ็นต์ต่อ PHB เริ่มต้น แต่เมื่อบ่มสารผสมปฏิกิริยาในภาวะที่มีการเขย่าไม่พบโมโนเมอร์ R3HB เมื่อบ่มสารผสมปฏิกิริยาที่ pH เริ่มต้นในช่วงเท่ากับ 2.0-10.0 พบว่าปริมาณโมโนเมอร์ R3HB ที่ได้ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อควบคุมค่า pH ของสารผสมปฏิกิริยาด้วยบัฟเฟอร์ให้เท่ากับ 4.0-9.0 พบว่าที่ค่า pH เท่ากับ 5.5 เซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตโมโนเมอร์ R3HB สูงที่สุด ปริมาณของโมโนเมอร์ R3HB เท่ากับ $1.62 \pm 5.11 \times 10^{-2}$ กรัมต่อลิตร คิดเป็น 94.74 เปอร์เซ็นต์ต่อ PHB เริ่มต้น แต่ที่ค่า pH เท่ากับ 4.0 ไม่พบโมโนเมอร์ R3HB เมื่อนำเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 หลังทำปฏิกิริยาดีพอลิเมไรเซชัน ทั้งที่ pH เท่ากับ 4.0 และ 5.5 ไปตรวจหาโมโนเมอร์ R3HB ภายในเซลล์ พบว่าไม่มีโมโนเมอร์ R3HB เหลืออยู่ภายในเซลล์ นำเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ภายหลังดีพอลิเมอไรเซชันไปตรวจหา PHB พบว่าที่ค่า pH เท่ากับ 4.0 มีปริมาณ PHB มากที่สุดเท่ากับ 1.10 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 29.64 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และที่ค่า pH เท่ากับ 5.5 มีปริมาณ PHB น้อยที่สุดเท่ากับ 0.02 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 0.55 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ได้พบว่าอะซิเตตเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากทุกตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี พบว่าที่ค่า pH เท่ากับ 4.0, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กิจกรรมจำเพาะสูงสุดของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase เท่ากับ 1.21 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อนำ *Bacillus* sp. BA-019 ไปจัดจำแนกสปีชีส์ด้วยวิธีตรวจหาลำดับ 16S rDNA เปรียบเทียบกับ GenBank พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ *Bacillus megaterium* เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

4472220023 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY **TE 162546**

KEY WORD: PHB / depolymerization / R3HB / PHB depolymerase / R3HB dehydrogenase

KUSUMA KAMOLJARATSOPHA : R-(-)-3-HYDROXYBUTYRIC ACID PRODUCTION BY DEPOLYMERIZATION IN *Bacillus* sp. BA-019. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SONGSRI KULPREECHA, Ph. D., THESIS COADVISOR: ASSOC. PROF. AMORN PETSOM, Ph.D., 120 pp. ISBN 974-17-6204-6.

R-(-)-3-hydroxybutyric acid production from PHB by depolymerization in *Bacillus* sp. BA-019 was investigated. High amount of PHB was produced while cane sugar was used as C-source, urea as N-source; 4.67 g/l of DCW and 2.07 g/l of PHB or 44.40 % by DCW were obtained. PHB content was shown increased up to 2.54 g/l or 55.75 % by DCW when trace elements was increased to 2 ml/l. Monomer R3HB was produced via depolymerization of the maximum PHB-containing cells. The activity of depolymerization reaction was observed by the amount of monomer R3HB produced and was analyzed by HPLC. The optimum temperature for depolymerization was studied. Cells were suspended in sterile distilled water and reaction mixture was incubated at 30, 37 and 45°c, initial pH 7.0 without agitation (static condition). The highest amount of R3HB at the concentration of $0.36 \pm 9.47 \times 10^{-2}$ or 13.95 % by initial amount of PHB was determined at 37°c. No R3HB was detected under the agitation condition. There was no different in R3HB content obtained from the depolymerization reaction at the initial pH ranged between 2.0-10.0. When pH of reaction mixture was controlled by using buffers in the range of 4.0-9.0, the highest yield of R3HB at $1.62 \pm 5.11 \times 10^{-2}$ g/l or 94.74 % by initial PHB content was measured at the controlled pH of 5.5. No R3HB was detected when pH of the reaction mixture was controlled at 4.0. After depolymerization at controlled pH 4.0 and 5.5, residual R3HB and intracellular PHB were determined, there were no R3HB detected inside the cells. As for intracellular PHB, the highest PHB content of 1.10 g/l or 29.64 % by DCW was obtained at the controlled pH of 4.0, while the lowest amount of PHB at 0.02 g/l or 0.55 % by DCW was detected at the controlled pH of 5.5. Acetate was found to be the by-product in all samples analyzed by HPLC. The highest specific activity of R3HB dehydrogenase; 1.21 U.mg protein^{-1}, was shown under the optimum pH 4.0 and 37°c. To identify species of *Bacillus* strain BA-019, 16S rDNA, sequence method was used in comparing to those data of the GenBank. The result showed that strain BA-019 was 99% identity with that of *Bacillus megaterium* .