

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



247797

การผลิตฮอร์โมนพืชจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* (3-ไฮดรอกซีบีบีเทค)
จากน้ำอ้อยดิบ *Bacillus megaterium* BA-019

นางสาวศิริกัญญา แก้วประคับ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยที่ศึกษาผลกระทบของฮอร์โมนพืชที่มีต่อการเจริญเติบโตของพืช
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางเกษตรกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ฉบับที่ 1 ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๐๐๐๒๕๒๔๗๐

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



247797

การผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)

จากน้ำอ้อยโดย *Bacillus megaterium* BA-019



นางสาวศรีัญญา แก้วประดับ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4 9 7 2 6 0 8 4 2 3

PRODUCTION OF BIODEGRADABLE PLASTIC POLY(3-HYDROXYBUTYRATE)
FROM SUGAR CANE LIQUOR BY *Bacillus megaterium* BA-019

Miss Sarinya Kaewpradub

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิด
พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) จากน้ำย่อยโดย

Bacillus megaterium BA-019

โดย

นางสาวศรีญา แก้วประดับ

สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโท



.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธานีวัน)



.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา)



.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปั่นพานิชการ)



.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช)

ศรียญา แก้วประดับ : การผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) จากน้ำอ้อยโดย *Bacillus megaterium* BA-019. (PRODUCTION OF BIODEGRADABLE PLASTIC POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) FROM SUGAR CANE LIQUOR BY *Bacillus megaterium* BA-019) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร. สงศรี กุลปรีชา, 104 หน้า.

247797

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต P(3HB) เพื่อเพิ่มผลผลิตของ P(3HB) โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและหาได้ง่าย ได้แก่ น้ำอ้อย ศึกษาความเข้มข้นของน้ำอ้อยที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ศึกษาผลของการจำกัดธาตุอาหาร จำเป็นบางชนิดที่มีต่อการเจริญ การสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ซึ่งเป็นการเจริญในภาวะที่ไม่สมดุล ศึกษาการจำกัดความเข้มข้นของ ไนโตรเจนในรูปของยูเรีย ความเข้มข้นของแมกนีเซียมในรูปของ แมกนีเซียมซัลเฟตไฮดรอกไซด์และผลร่วมระหว่างโพแทสเซียมและฟอสเฟตในรูปของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เพื่อกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) เพิ่มมากขึ้น ผลการวิจัยพบว่า *B.megaterium* BA-019 สามารถเจริญพร้อมกับการผลิต P(3HB) ได้ดีโดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการศึกษาพบว่า *B.megaterium* BA-019 สามารถเจริญและผลิต P(3HB) ได้ดีในภาวะการเจริญ ดังนี้ แหล่งคาร์บอน คือ น้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจน คือ ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร และไม่ต้องมีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตไฮดรอกไซด์ โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 9.21 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 4.62 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 50.12 เปอร์เซ็นต์คือน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.38 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ศึกษาการผลิต P(3HB) ในถังหมัก โดย *B. megaterium* BA-019 โดยใช้ภาวะที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าไปเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อผลิต P(3HB) ในถังหมักโดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุด เท่ากับ 9.61 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 3.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 42.52 เปอร์เซ็นต์คือน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 6 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.51 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง พบว่าปริมาณ P(3HB) สูงสุดที่ผลิตได้ต่ำกว่าเมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในขวดเขย่า แต่ความหนาแน่นของเซลล์และอัตราการผลิต P(3HB) เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักสูงกว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....(ศรีณญา) แก้วประดับ.....
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่อที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....S. Kulpachai.....
ปีการศึกษา.....2553.....

4972608423 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORDS : *Bacillus megaterium* BA-019/ POLY(3-HYDROXYBUTYRATE)/

SUGAR CANE LIQUOR

SARINYA KAEWPRADUB : PRODUCTION OF BIODEGRADABLE PLASTIC
POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) FROM SUGAR CANE LIQUOR BY

Bacillus megaterium BA-019). THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SONGSRI

KULPREECHA, Ph.D., 104 pp.

247797

This research aimed to study the factors that affected P(3HB) production by *Bacillus megaterium* BA-019 in order to increase the production yield of P(3HB) using sugarcane liquor which is inexpensive and locally available. The effects of initial concentration of sugarcane liquor and certain nutrients limitation (unbalanced growth condition) on cell growth as well as P(3HB) biosynthesis and accumulation were investigated. Limited amount of some components in the fermentation medium including nitrogen (urea), magnesium ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) and a cooperation effect of potassium and phosphate (KH_2PO_4) was investigated. The results showed that *B. megaterium* BA-019 could grow and produce relatively high P(3HB) simultaneously when sugarcane liquor and urea were used as the carbon and nitrogen sources, respectively. An optimal fermentation medium yielding high P(3HB) production from *B. megaterium* BA-019 consisted of 30 g/l of total sugar in sugarcane liquor as a carbon substrate, 0.8 g/l of urea as a nitrogen substrate and 2.0 g/l of KH_2PO_4 with no requirement of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ addition. Under this condition, the maximum cell density of 9.21 g/l and P(3HB) concentration of 4.62 g/l (50.12% by DCW) were achieved at 12 h of cultivation. At the same time, the highest productivity of 0.38 g/l-h was also reached. Moreover, fermentation in 5 L fermenter was carried out using the same fermentation medium containing sugarcane liquor. The maximum cell density of 9.61 g/l and P(3HB) concentration of 3.07 g/l (42.52 % by DCW) were reached at 6 h of cultivation as well as the highest productivity of 0.51 g/l-h. This results implied that the content of P(3HB) production in 5 L fermenter was lower than in shaken flask but cell density and P(3HB) productivity were higher than that of shaken flask cultivation.

Department Microbiology Student's signature Sarinya Kaenpradub
Field of Study Industrial Microbiology Advisor's signature S Kulprecha
Academic Year 2010

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก
รองศาสตราจารย์ ดร. ส่องศรี กุลปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำแก่
ข้าพเจ้า ทำให้สามารถทำงานวิจัยได้สำเร็จ ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น
ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการ
สอบ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และรองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช
ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ัญญา ทองจุล อาจารย์วัฒนา โตเลียง และอาจารย์ ดร.
กฤษณา ศิริเลิศมกุล ที่กรุณาให้คำแนะนำและความช่วยเหลือ

ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ ในห้องวิจัย 462 ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือและคอยให้กำลังใจ
กันในการทำวิจัยตลอดมา

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาคอุตสาหกรรมวิทย์ฯ ทุกคน ตลอดจนพี่ๆ และน้องๆ ที่ให้กำลังใจ ความ
ช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยด้วยดีตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวของข้าพเจ้า ซึ่งเป็นกำลังใจที่
สำคัญที่สุดที่คอยสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ท
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 มูลเหตุจูงใจในการวิจัย.....	2
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2. ปรีทัศน์วรรณกรรม.....	4
2.1 พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ.....	4
2.2 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (polyhydroxyalkanoate).....	5
2.3 โครงสร้างของ PHA.....	6
2.4 การจัดจำแนกชนิดของ PHA.....	7
2.5 พอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly-β -hydroxybutyrate)	7
2.6 โครงสร้างและคุณสมบัติของ P(3HB)	11
2.7 วิธีการสังเคราะห์ P(3HB).....	14
2.8 หน้าที่ของ P(3HB).....	16
2.9 แนวทางการนำ PHA ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์.....	17
2.10 การผลิต P(3HB) จากจุลินทรีย์โดยใช้แหล่งคาร์บอนมากเกินไปและ จำกัดสารอาหารบางชนิด.....	19
2.11 แหล่งคาร์บอน.....	21
2.12 กระบวนการผลิตน้ำตาลทราย.....	24
2.13 ประโยชน์จากอ้อย.....	27

2.14 แหล่งไนโตรเจน.....	28
2.15 กระบวนการหมักแบบ batch	29
2.16 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์.....	30
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.....	31
3.1 วัสดุอุปกรณ์.....	31
3.2 เคมีภัณฑ์.....	32
3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	33
3.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา.....	33
3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	33
3.3.3 การเก็บรักษาจุลินทรีย์.....	35
3.3.4 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต P(3HB) จาก <i>Bacillus megaterium</i> BA-019 โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดทดลองภายใต้ภาวะการเจริญที่สมดุล (balanced growth condition).....	35
3.3.5 ศึกษาผลของการจำกัดธาตุอาหารแต่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินไปที่มีต่อการเจริญ การสังเคราะห์และสะสม P(3HB).....	36
3.3.6 การผลิต P(3HB) จาก <i>Bacillus megaterium</i> BA-019 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) ที่ศึกษาได้จากข้อ 3.3.5.2 มาเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	37
3.4 วิธีวิเคราะห์.....	38
3.4.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง.....	38
3.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด.....	38
3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณยูเรีย.....	38
3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography: GC).....	39
3.4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำอ้อยด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิด โครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC).....	39
4. ผลการทดลอง.....	40
4.1 การศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต.....	40
4.2 การผลิต P(3HB) จาก <i>Bacillus megaterium</i> BA-019 โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดทดลองภายใต้ภาวะการเจริญที่สมดุล.....	42

4.3 ศึกษาผลของการจำกัดธาตุอาหารแต่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินไปที่มีต่อการเจริญ การสังเคราะห์และสะสม P(3HB).....	45
4.3.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำอ้อยที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต P(3HB).....	45
4.3.2 การศึกษาผลของการจำกัดปริมาณไนโตรเจน.....	50
4.3.3 การศึกษาผลของการจำกัดปริมาณแมกนีเซียม.....	60
4.3.4 การศึกษาผลรวมของการจำกัดโพแทสเซียมและฟอสเฟต.....	65
4.4 การผลิต P(3HB) จาก <i>Bacillus megaterium</i> BA-019 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) ที่ศึกษาได้ในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	74
4.4.1 การผลิต P(3HB) จากน้ำอ้อย.....	74
4.4.2 การผลิต P(3HB) จากกากน้ำตาล.....	74
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	79
5.1 การศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต.....	79
5.2 การผลิต P(3HB) จาก <i>Bacillus megaterium</i> BA-019 โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดทดลองภายใต้ภาวะการเจริญที่สมดุล.....	80
5.3 ศึกษาผลของการจำกัดธาตุอาหารแต่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินไปที่มีต่อการเจริญ การสังเคราะห์และสะสม P(3HB).....	81
5.3.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำอ้อยที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต P(3HB).....	81
5.3.2 การศึกษาผลของการจำกัดปริมาณไนโตรเจน.....	82
5.3.3 การศึกษาผลของการจำกัดปริมาณแมกนีเซียม.....	83
5.3.4 การศึกษาผลรวมของการจำกัดโพแทสเซียมและฟอสเฟต.....	84
5.4 การผลิต P(3HB) จาก <i>Bacillus megaterium</i> BA-019 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) ที่ศึกษาได้ในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	85
5.4.1 การผลิต P(3HB) จากน้ำอ้อย.....	85
5.4.2 การผลิต P(3HB) จากกากน้ำตาล.....	85
รายการอ้างอิง	89
ภาคผนวก.....	95
ภาคผนวก ก การเตรียมวัตถุดิบและสารที่ใช้ในการวิจัย.....	96
ภาคผนวก ข สูตรคำนวณ.....	98
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน.....	99

ภาคผนวก ง โครมาโทแกรม.....	102
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	104

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างและสะสม PHA	9
2.2	สมบัติการละลายของ P(3HB).....	12
2.3	สมบัติทางกายภาพและความร้อนของ P(3HB) เทียบกับพอลิพรอพิลีน.....	13
2.4	องค์ประกอบของน้ำอ้อย.....	23
4.1	การเติบโตของ <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ.....	41
4.2	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 23 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน).....	44
4.3	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 34 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน).....	46
4.4	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 45 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน).....	47
4.5	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 57 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน).....	48
4.6	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่ไม่มีการเติมยูเรีย (แมกนีเซียมซัลเฟตไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร).....	52
4.7	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร).....	53

4.22	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3.0 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรต).....	72
4.23	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาล รวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	76
4.24	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้นของ น้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้ อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	77
4.25	ค่าอัตราการผลิต เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยและ กากน้ำตาลความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถัง หมักขนาด 5 ลิตร.....	78
5.1	เปรียบเทียบการผลิต P(3HB) โดยใช้จุลินทรีย์และเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน...	88

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	เซลล์ที่ย้อมด้วยสีไนล์บลู เอ (ก) และสีชูดานแบลค บี (ข).....	5
2.2	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ PHA	6
2.3	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ P(3HB).....	8
2.4	ภาพตัดของเซลล์ <i>Halomonas boliviensis</i> จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดง P(3HB) แกรนูลภายในเซลล์ (ก) และส่วนประกอบของ P(3HB) แกรนูล (ข).....	8
2.5	โครงสร้างผลึกของ P(3HB).....	11
2.6	วิธีการสังเคราะห์ P(3HB).....	15
2.7	วิธีการสังเคราะห์ P(3HB) โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ.....	16
2.8	กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายดิบ (ก) และน้ำตาลรีไฟน์ (ข).....	26
3.1	<i>Bacillus megaterium</i> BA-019 เมื่อย้อมสีแกรม กำลังขยาย 1,000 เท่า.....	33
3.2	<i>Bacillus megaterium</i> BA-019 เมื่อย้อมสีชูดานแบลค บี กำลังขยาย 1,000 เท่า.....	33
4.1	การเติบโตของ <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ.....	41
4.2	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 23 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน).....	44
4.3	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 34 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน).....	46
4.4	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 45 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน).....	47
4.5	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 57 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน).....	48

- 4.6 ความหนาแน่นของเซลล์ และปริมาณ P(3HB) สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมแตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 20 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร..... 49
- 4.7 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่ไม่มีการเติมยูเรีย (แมกนีเซียมซัลเฟตไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)..... 52
- 4.8 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร(แมกนีเซียมซัลเฟตไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)..... 53
- 4.9 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.4 กรัมต่อลิตร(แมกนีเซียมซัลเฟตไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)..... 54
- 4.10 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.6 กรัมต่อลิตร(แมกนีเซียมซัลเฟตไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)..... 55
- 4.11 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)..... 56
- 4.12 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)..... 57

รูปที่	หน้า
4.13 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 1.2 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร).....	58
4.14 ความหนาแน่นของเซลล์และปริมาณ P(3HB) สูงสุด เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมยูเรีย.....	59
4.15 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่ไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร).....	61
4.16 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร).....	62
4.17 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร).....	63
4.18 ความหนาแน่นของเซลล์และปริมาณ P(3HB) สูงสุด เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 0.2 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต.....	64
4.19 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่ไม่มีการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต).....	66
4.20 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต).....	67

รูปที่	หน้า
4.21 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อ ลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตไฮดรอกไซด์).....	68
4.22 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 1.5 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อ ลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตไฮดรอกไซด์).....	69
4.23 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อ ลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตไฮดรอกไซด์).....	70
4.24 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อ ลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตไฮดรอกไซด์).....	71
4.25 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3.0 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตไฮดรอกไซด์).....	72
4.26 ความหนาแน่นของเซลล์ และปริมาณ P(3HB) สูงสุด เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต...	73
4.27 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาล รวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	76

รูปที่	หน้า
4.28 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้นของ น้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้ อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	77
4.29 ความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณ P(3HB) และค่าอัตราการผลิตสูงสุด เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยและกากน้ำตาลความเข้มข้นของ น้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้ อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	78

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ตัวย่อ

DCW

g/l

g/l-h

h

PHB / P(3HB)

P(3HB) conc.

P(3HB) prod.

% DCW

 μ

คำอธิบาย

น้ำหนักเซลล์แห้ง

กรัมต่อลิตร

กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ชั่วโมง

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตหรือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)

ความเข้มข้นของ P(3HB)

อัตราการผลิต P(3HB)

เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

อัตราการเติบโตจำเพาะ