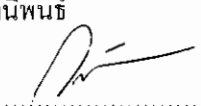
การผลิต Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) ของ *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาร่วมกับการได้รับ 2-aminoanthracene

ขวัญใจ แก้วจันทร์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
มิถุนายน 2554
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

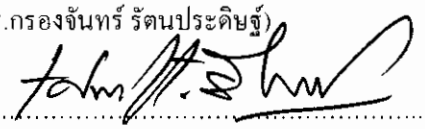
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ ขวัญใจ แก้วจันทร์ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์



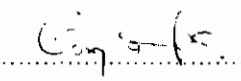
..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์)



..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

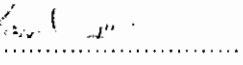
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์)



..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

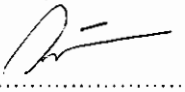
(ดร.อัญชนา พัฒนสุพงษ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



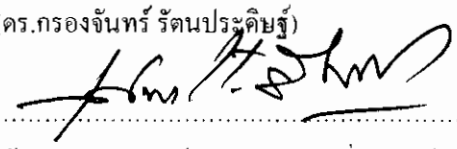
..... ประธาน

(ดร.สมจิตต์ ปาละกาศ)



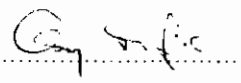
..... กรรมการ

(ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์)



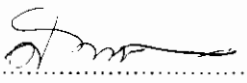
..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์)



..... กรรมการ

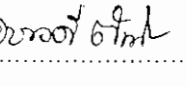
(ดร.อัญชนา พัฒนสุพงษ์)



..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริโฉม ทุ่งเก้า)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพา



.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุษาวดี ตันติวรานุรักษ์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. 2554

ประกาศคุณูปการ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา และเสนอแนะแนวทางการทำวิจัย ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณดร.สมจิตต์ ปาละกาศ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เสรษฐวัชร ฉ่ำศาสดร์ ดร.อัญชณา พัฒนสุพงษ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริโฉม ทุ่งเก้า ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณโครงการวิจัยเรื่อง "การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพลาสติกชีวภาพด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่กลายพันธุ์โดยการเหนี่ยวนำ" ในโครงการความร่วมมือในการผลิตนักวิจัยและพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พิษวิทยา และการบริหารจัดการสารเคมี สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย และหน่วยงานวิจัยต่างๆ ที่ประกอบด้วย 1) ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย 2) ศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พิษวิทยา และการบริหารจัดการสารเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล 3) ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และ 4) ศูนย์วิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 5) ห้องปฏิบัติการ วิศวกรรมกระบวนการชีวภาพ ตึกชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สถานที่วิจัยและเครื่องมืออุปกรณ์เพื่อการวิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณ คุณแม่ พี่น้อง ที่เป็นกำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด และพี่ๆ เพื่อนๆ สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม และน้องๆ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ขวัญใจ แก้วจันทร์

51911831: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม; วท.ม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)
คำสำคัญ: พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต/ *Alcaligenes lactus* TISTR 1403/ ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลัง/ 2-aminoanthracene (2-AA)/ รังสีแกมมา

ขวัญใจ แก้วจันทร์: การผลิต Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) ของ Alcaligenes lactus TISTR 1403 ที่ ผ่านการฉายรังสีแกมมาร่วมกับการได้รับ 2-aminoanthracene (POLY-β-HYDROXYBUTYRATE (PHB) PRODUCTION OF *ALCALIGENES LACTUS* TISTR 1403 TREATED WITH GAMMA RADIATION AND 2-AMINOANTHRACENE)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ Ph.D., เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์ Ph.D., อัญชนา พัฒนสุพงษ์ Ph.D., ค.ด.145 หน้า. ปี พ.ศ. 2554.

การเปรียบเทียบการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากแบคทีเรีย *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 (สายพันธุ์เดิม) และ *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 ที่ได้รับการทรีตด้วยรังสีแกมมา สาร 2-aminoanthracene (2-AA) และรังสีแกมมาร่วมกับ 2-AA เลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงสำหรับผลิต PHB ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่า *A. lactus* TISTR 1403 / γ-2AA สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHB ได้เท่ากับ 1.50 และ 0.60 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 40 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) เท่ากับ 0.58 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งมากกว่า *A. lactus* TISTR 1403 ที่ได้รับรังสีแกมมา หรือ สาร 2-AA เพียงอย่างเดียว และสายพันธุ์เดิม เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกันสำหรับผลิต PHB ได้แก่ ฟรุคโตส ซูโครส (Lab. grade) ซูโครสทางการค้า (น้ำตาลทรายขาวมิตรผล น้ำตาลทรายแดงมิตรผล น้ำตาลแร่ธรรมชาติมิตรผล) มอลโทเด็กซ์ทรินทางการค้า ไฮโดรไลเซทของแป้งมันสำปะหลัง และไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลัง พบว่าการใช้ซูโครส และน้ำตาลแร่ธรรมชาติมิตรผล มีการผลิต PHB ได้ถึงร้อยละ 80 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่การใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลัง แบคทีเรียสามารถผลิต PHB ได้ร้อยละ 57 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งมากกว่าในชุดควบคุมที่ใช้กลูโคส (ร้อยละ 50 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) จากการความเข้มข้นเริ่มต้นของไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลัง ช่วงระหว่าง ร้อยละ 30-70 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เพื่อศึกษาการผลิต PHB พบว่าการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเข้มข้นร้อยละ 50 ผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 1.08 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 94.73 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และจากการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ คือ

แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมอะซิเตรต หรือ ยูเรีย พบว่าการใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน แบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 /γ- 2AA ผลิตมวลเซลล์ และ PHB ได้สูงสุด เท่ากับ 6.60 และ 2.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 39.61 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่พบว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนแบคทีเรียมีการสะสม PHB ภายในเซลล์ได้สูง คิดเป็นร้อยละ 70 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จากผลของการใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน พบว่าการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่าง C:N แบคทีเรียสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและPHB ได้ในปริมาณใกล้เคียงกัน ในขณะที่การใช้อัตราส่วน C:N เท่ากับ 15 ผลิตได้สูงสุด เท่ากับ 4.44 และ 2.60 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 58.55 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ

การเลี้ยง *A. lactus* TISTR 1403 /γ- 2AA ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตรพบว่าแบคทีเรียผลิตมวลเซลล์และ PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 4.53 และ 2.47 กรัมต่อลิตร ตามลำดับคิดเป็นร้อยละ 54.52 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง คิดเป็นสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) เท่ากับ 0.66 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) เท่ากับ 0.32 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป และ สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร(Yp/s) เท่ากับ 0.24 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ในการตรวจสอบชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จาก *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยเครื่อง GC-MS ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ พบว่า เป็นพอลิเมอร์ชนิดเดียวกับสารมาตราฐาน PHB มีมวลสเปคตรัม เท่ากับ 74, 87 และ103 จากการทดลองทั้งหมดพบว่า การใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน แบคทีเรียสามารถผลิต PHB ได้มากกว่าการใช้กลูโคส 76.6 เท่า

51911831 : MAJOR: ENVIRONMENTAL SCIENCE; M.Sc.
(ENVIRONMENTAL SCIENCE)
KEYWORDS: POLYHYDROXYBUTYRATE / *ALCALIGENES LACTUS* TISTR 1403 / CASSAVA PULP HYDROLYSATE/ 2-AMINOANTHRACENE / GAMMA RADIATION

KWANJAI KAEWJAN: POLY-β-HYDROXYBUTYRATE (PHB) PRODUCTION OF *ALCALIGENES LACTUS* TISTR 1403 TREATED WITH GAMMA RADIATION AND 2-AMINOANTHRACENE. ADVISORY COMMITTEE: KRONGCHAN RATANAPHADIT, Ph.D., SAETHAWAT CHAMSART, Ph.D., ANCHANA PATTANASUPONG, Ph.D. 145 P.2011.

Comparative production of Polyhydroxybutyrate by *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 (parental strain) and the one treated with gamma radiation, 2-aminoanthracene (2-AA) and with gamma radiation and 2-AA was studied using a modified PHB production medium with glucose as the carbon source cultivated on a shaker at 200 rpm and at room temperature. *A. lactus* TISTR 1403 / γ-2AA produced cell biomass (cell dry weight) and PHB at concentrations of 1.50 and 0.60 (g/L) with a PHB content of 40 % of the dry cell weight and a PHB yield coefficient (Yp/x) of 0.58 g/g higher than those *of A. lactus* TISTR 1403 treated with only gamma radiation or only 2-aminoanthracene and parental strain.Different carbon sources i.e. fructose, Lab. grade sucrose, commercial sucrose (Mitr Phol white sugar, natural mineral sugar and brown sugar), commercial maltodextrin, cassava starch hydrolysate, and cassava pulp hydrolysate were used for the production of PHB. It was found that Lab. grade sucrose and Mitr Phol natural mineral sugar gave PHB of 80% of dry cell weight whilst cassava starch hydrolysate gave PHB of 57% of dry cell weight higher than that of the control using glucose (50 % of PHB of dry cell weight).The initial cassava pulp hydrolysate concentrations ranging from 30 to 70 % (v/v) were studied for the production of PHB. The result showed that that of 50% (v/v) gave a maximum PHB concentration of 1.08 g/L with a content of 94.73 % of the dry cell weight. Using different nitrogen sources i.e. ammonium sulfate, ammonium chloride, ammonium nitrate, ammonium acetate and urea, with ammonium nitrate

A. lactus TISTR 1403 /γ-2AA produced cell dry weight and PHB at concentrations of 6.60 and 2.08 (g/L), respectively with a PHB content of 39.61% of the dry cell weight. However, ammonium sulfate gave the highest PHB content of 70 % of the dry cell weight. The effect of carbon to nitrogen ratios was studied using ammonium sulfate with cassava pulp hydrolysate at a concentration of 50% (v/v). Found that all the C:N ratios, *A. lactus* TISTR 1403/γ-2AA produced similar coneentrations of cell dry weight and PHB whilst the C:N ratio of 15 gave maximum dry cell weight and PHB at concentrations of 4.44 and 2.60 (g/L), respectively with a PHB content of 58.55 % of the dry cell weight.

Cultivation of *A. lactus* TISTR 1403 /γ- 2AA in a 5-L bioreactor produced cell dry weight and PHB at concentrations of 4.53 and 2.47 (g/L), respectively with a PHB content of 54.52 % of the dry cell weight, a PHB yield coefficient (Yp/x) of 0.66 (g/g of cell dry weight), a cell yield coefficient (Yx/s) of 0.32 (g/g reducing sugar consumed) and a PHB yield coefficient of PHB (Yp/s) of 0.24 (g/g reducing sugar consumed). Type and quantitative analysis of biopolymer produced by *A. lactus* TISTR 1403/γ-2AA cultivated with cassava pulp hydrolysate as carbon source was investigated with a GC-MS. The result showed that the polymer was the same type as the standard PHB with mass spectra (m/z) of 74, 87 and 103. From all experiments, cassava pulp hydrolysate as the carbon source gave a PHB yield of 76.6 times greater than that of glucose.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญภาพ..... ฐ

บทที่

1 บทนำ..... 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

สมมติฐานของการวิจัย..... 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 3

ขอบเขตของการวิจัย..... 4

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 5

พอลิเอสเทอร์ทางชีวภาพ..... 5

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates)..... 5

พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต (Poly-β-hydroxybutyrate)..... 8

กระบวนการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต..... 9

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHB ของจุลินทรีย์..... 11

การกลาย..... 20

3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 23

วัสดุและอุปกรณ์..... 23

วิธีการดำเนินการวิจัย..... 25

วิธีการเคราะห์..... 30

4 ผลการวิจัย..... 33

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	การเจริญของ *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำ	33
	สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB	38
	ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของ *A. lactus* TISTR 1403 / γ-2AA	38
	ความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน	45
	ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์	52
	ผลอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์	58
	ผลของความเป็นกรดด่าง	64
	ความสามารถในการผลิต PHB ของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	69
	การตรวจสอบชนิดและปริมาณของ PHB	72
5	อภิปรายและสรุปผล	78
	อภิปราย	78
	สรุปผลการทดลอง	88
	ข้อเสนอแนะ	89
บรรณานุกรม		90
ภาคผนวก		99
	ภาคผนวก ก	100
	ภาคผนวก ข	102
	ภาคผนวก ค	109
ประวัติย่อของผู้วิจัย		128

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2-1 ตัวอย่างแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต พร้อมทั้งชนิดแหล่งคาร์บอนที่ใช้ และชนิดของ PHA ที่สังเคราะห์ได้..... 6

2-2 คุณสมบัติของ PHB เทียบกับพอลิโพรพิลีน (PP)..... 8

2-3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHB ได้ในธรรมชาติ..... 12

2-4 เปรียบเทียบผลผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต และแหล่งคาร์บอนที่ใช้..... 14

4-1 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และ ร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ ของ *A. lactus* TISTR 1403, *A. lactus* TISTR 1403/ γ, *A. lactus* TISTR 1403/ 2AA และ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตรสำหรับผลิต PHB ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง..... 37

4-2 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และ ร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่ระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน..... 40

4-3 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สูงสุดของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่ระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน..... 44

4-4 องค์ประกอบทางเคมีกายภาพของกากมันสำปะหลังแห้ง..... 45

4-5 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นและระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน..... 48

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4-6 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และ สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สูงสุดของ *A.lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซท ของกากมันสำปะหลังที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น และระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน 50

4-7 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ ของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ แหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน ที่ระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน 55

4-8 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) ของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจน ต่างชนิดกัน ที่ระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน 58

4-9 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ ของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) และระยะเวลาการเลี้ยง แตกต่างกัน 61

4-10 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สูงสุดของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้อัตราส่วนระหว่าง คาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) และระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน 63

4-11 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ ของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่า ความเป็นกรดด่างและระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน 67

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4-12 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จาก สารอาหาร(Yx/s) และสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สูงสุดของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่มี ค่าความเป็นกรดด่างแตกต่างกัน ที่ระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน..... 68

4-13 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จาก สารอาหาร (Yx/s) และสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สูงสุดของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตรที่ระยะเวลาการเลี้ยง 24 ชั่วโมง..... 71

4-14 ปริมาณของ PHB ที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของ *A. lactus* TISTR 1403 และ *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน PHB จาก Aldrich..... 77

5-1 เปรียบเทียบผลผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตและแหล่งไนโตรเจนที่ใช้..... 83

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2-1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต..... 6

2-2 วิถีการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตในแบคทีเรีย..... 10

2-3 การแสดงออกของ *phaCBA* cluster สำหรับการสังเคราะห์ PHB..... 11

4-1 การเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร NB..... 33

4-2 ลักษณะโคโลนีของ *A. lactus* TISTR 1403 (A), *A. lactus* TISTR 1403 / γ(B)
A. lactus TISTR 1403 /2AA (C) *A. lactus* TISTR 1403 / γ-2AA (D)
ที่เลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส..... 34

4-3 การเจริญ *A. lactus* TISTR 1403, *A. lactus* TISTR 1403 / γ ,
A. lactus TISTR 1403 /2AA และ *A. lactus* TISTR 1403 / γ-2AA
ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร NB..... 35

4-4 การเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403 และ *A. lactus* TISTR 1403 / γ-2AA
ที่เลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตรสำหรับผลิต PHB..... 36

4-5 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB สูงสุดของ *A. lactus* TISTR 1403 และ
A. lactus TISTR 1403 / γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตรสำหรับผลิต PHB..... 37

4-6 การเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่ง
คาร์บอนชนิดต่าง ๆ..... 39

4-7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA
ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ..... 39

4-8 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB สูงสุดของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA
ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ 41

4-9 การเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซท
ของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นแตกต่างกัน..... 46

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นแตกต่างกัน 47

4-11 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB สูงสุดของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นแตกต่างกัน 49

4-12 ลักษณะของแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนโดยย้อมสีเซลล์ด้วย sudan black B ที่กำลังขยาย 100 เท่า 51

4-13 การเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน 53

4-14 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน 53

4-15 ปริมาณไนโตรเจนที่ถูกใช้ไปของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน 54

4-16 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB สูงสุดของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน 56

4-17 การเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) แตกต่างกัน 59

4-18 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) แตกต่างกัน 60

4-19 ปริมาณไนโตรเจนที่ถูกใช้ไปของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) แตกต่างกัน 62

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-20 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB สูงสุดของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) แตกต่างกัน..... 64

4-21 การเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างแตกต่างกัน..... 65

4-22 ค่าความเป็นกรดด่างของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างแตกต่างกัน..... 65

4-23 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างแตกต่างกัน..... 66

4-24 ปริมาณไนโตรเจนที่ถูกใช้ไปของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างแตกต่างกัน..... 67

4-25 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB สูงสุดของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA เลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างแตกต่างกัน..... 67

4-26 การเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร..... 67

4-27 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือและปริมาณไนโตรเจนที่ถูกใช้ไปของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร..... 69

4-28 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB ของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร..... 70

4-29 โครมาโตแกรมของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน..... 71

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-30 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน PHB จาก Aldrich โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็น internal standard..... 73

4-31 มวลสเปคตัมของ Butanoic acid 4- hydroxy-methyl ester ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *A.lactus* TISTR 1403 /γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนเทียบกับมวลสเปคตัมของสาร PHB จากLibrary search NIST08..... 73

4-32 สูตรโครงสร้างของ Butanoic acid, 4- hydroxy-methyl ester ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน..... 74

4-33 มวลสเปคตัมของ Pentanoic acid, 4- hydroxy-methyl ester ที่ retention time เท่ากับ 8.635 ที่สกัดได้จาก แบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับมวลสเปคตัมของสาร PHB จาก Library search NIST08..... 74

4-34 สูตรโครงสร้างของ Pentanoic acid, 4- hydroxy-methyl ester ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน..... 75

4-35 มวลสเปคตัมของ Pentanoic acid, 4-oxo-, methyl ester ที่ retention time เท่ากับ 9.244 นาทีที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับมวลสเปคตัมของสาร PHB จาก Library seareh NIST08..... 75

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-35 มวลสเปคตัมของ Pentanoic acid, 4-oxo-, methyl ester ที่ retention time เท่ากับ 9.244 นาทีที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน เปรียบเทียบกับมวลสเปคตัมของสาร PHB จาก Library search NIST08 76

4-36 สูตรโครงสร้างของ Pentanoic acid, 4-oxo-, methyl ester ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน 76