สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(13)
รายการภาพ	(14)
บทที่	
1 บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
Poly-β-hydroxybutyrate	3
การแบ่งกลุ่มของสารพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรต	4
การสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรตและโคพอลิเมอร์ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ	7
คุณลักษณะทางกายภาพของพอลิเมอร์กลุ่ม PHA	14
ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHB	15
สายพันธุ์จุลินทรีย์	15
แหล่งอาหาร	17
แหล่งคาร์บอน	17
แหล่งไนโตรเจน	19
อาหารเสริมเกลือแร่	21
ออกซิเจน	22
พีเอช	22
อุณหภูมิ	22
การสกัดแยก PHB	23
การสกัดด้วยตัวทำละลาย	23
การสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์	23
การสกัดเอนไซม์	23

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
การประยุกต์ใช้สารพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรต	24
การประยุกต์ใช้ทางด้านวัสดุภัณฑ์	24
การประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์	25
The temporary scaffold	25
The temporary barrier	25
The drug delivery device	26
Multifunctional devices	27
แบคทีเรียสังเคราะห์แสง	26
การแบ่งกลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสง	26
Purple phototrophic bacteria	28
วงศ์ *Chromatiaceae*	28
วงศ์ *Ectothiorhodospiraceae*	28
วงศ์ *Rhodospirillaceae*	28
Green bacteria	29
วงศ์ *Chlorobiaceae*	29
วงศ์ *Chloroflexaceae*	29
Genera incertae sedis	30
วัตถุประสงค์	31
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	32
วัสดุ	32
จุลินทรีย์	32
อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ	32
อุปกรณ์	32
อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง	32
อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์	33
วิธีการวิเคราะห์	33

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
การเจริญของเชื้อ	33
ปริมาณเซลล์	33
การวิเคราะห์ปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีดรอกซีบิวทีเรต	34
การวิเคราะห์ปริมาณ PHB เชิงปริมาณ	34
การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ	34
การสกัดและตกตะกอนพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรต	34
วิธีการทดลอง	35
2.1 การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนค็ม	35
2.1.1 การเทียบเคียงตามสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา	35
2.1.1.1 การเทียบเคียงเชื้อในระดับวงศ์	35
2.1.1.2 การเทียบเคียงเชื้อในระดับสกุลและชนิด	35
2.1.2 การเทียบเคียงเชื้อโดยเทคนิค 16S rDNA	36
2.2 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์กลาย ที่มีคุณสมบัติในการผลิตโคพอลิเมอร์	
2.2.1 การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการผลิตพอลิเมอร์ภายในเซลล์	37
2.2.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน	37
2.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB	
2.3.1 ผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต	37
2.3.2 ผลของยีสต์สกัด	38
2.3.3 ผลของพีเอชเริ่มต้น	38
2.3.4 ผลของอุณหภูมิ	38
2.3.5 ผลของสภาวะการเลี้ยง	38
2.3.6 ผลของการให้อากาศ	39
2.3.7 ผลของการกวน	39
2.4 การคัดเลือกสารสกัดสำหรับพอลิเมอร์ภายในเซลล์	39
2.5 การศึกษาคุณลักษณะของโคพอลิเมอร์	39
2.5.1 หน่วยย่อยของพอลิเมอร์	39

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5.2 การวิเคราะห์หาอุณหภูมิหลอมเหลวตัวผลึก และอุณหภูมิแข็งตัวของผลึก	40
2.5.3 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นของพอลิเมอร์	40
2.5.4 การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของพอลิเมอร์	40
2.5.5 การวิเคราะห์ Crystallinity	40
2.5.6 การวิเคราะห์ลักษณะผลึกทางกายภาพด้วย SEM	41
2.5.7 การวิเคราะห์ชนิดพอลิเมอร์ด้วย ^{13}C NMR	41
3 ผลการทดลองและวิจารณ์	42
3.1 การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนด่าง	42
3.1.1 การเทียบเคียงตามสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา	42
3.1.2 การเทียบเคียงเชื้อโดยเทคนิค 16S rDNA	46
3.2 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์กลาย ที่มีคุณสมบัติในการผลิตโคพอลิเมอร์	
3.2.1 การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการผลิตพอลิเมอร์ภายในเซลล์	53
3.2.1.1 การย้อมเซลล์ด้วยสี Sudan black และ Thin-section electron microscopy	53
3.2.1.2 การคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนด่างระหว่างสายพันธุ์ดั้งเดิม *Rhodobacter sphaeroides* ES16 กับสายพันธุ์กลาย *Rhodobacter sphaeroides* N20 และU7	53
3.2.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน	57
3.2.2.1 ผลของกรดวาเลอริกที่ความเข้มข้นต่างๆ	57
3.2.2.2 ผลของกรดโพรพิโอนิกที่ความเข้มข้นต่างๆ	63
3.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB	73
3.3.1 ผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต	73
3.3.2 ผลของยีสต์สกัด	75
3.3.3 ผลของพีเอชเริ่มต้น	78
3.3.4 ผลของอุณหภูมิ	80
3.3.5 ผลของสภาวะการเลี้ยง	82

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.6 ผลของการให้อากาศ	85
3.3.7 ผลของการกวน	87
3.4 การคัดเลือกสารสกัดสำหรับพอลิเมอร์ภายในเซลล์	89
3.5 การศึกษาคุณลักษณะของโคพอลิเมอร์	91
3.5.1หน่วยย่อยของพอลิเมอร์	91
3.5.2 การวิเคราะห์หาอุณหภูมิหลอมเหลวตัวผลึก และอุณหภูมิแข็งตัวของผลึก	91
3.5.3 ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังชั่นของพอลิเมอร์	94
3.5.4 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของโคพอลิเมอร์	97
3.5.5 ผลการวิเคราะห์ Crystallinity	98
3.5.6 ผลการวิเคราะห์ลักษณะผลึกกายภาพด้วย SEM	99
3.5.7 ผลการวิเคราะห์ชนิดพอลิเมอร์ด้วย ^{13}C-NMR	102
4 สรุปผลการทดลอง	106
สรุป	106
ข้อเสนอแนะ	107
เอกสารอ้างอิง	108
ภาคผนวก ก	115
ภาคผนวก ข	120
ประวัติผู้เขียน	121

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	คุณสมบัติของ PHBV และพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ	14
2.	สายพันธุ์ของแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกในสกุล *Lactococcus* sp., *Pediococcus* sp. และ *Streptococcus* sp. ที่ผลิต PHB	16
3.	การผลิตสาร PHB จากจุลินทรีย์ โดยใช้สารอาหารราคาถูก	19
4.	ลักษณะของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง	27
5.	คุณลักษณะทางอนุกรมวิธานและทางชีวเคมีของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง สายพันธุ์ดั้งเดิม ES16 และสายพันธุ์กลาย N20 กับU7	47
6.	ผลการเทียบเคียงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ ES16 N20 และ U7	49
7.	ค่า Yeild ของพอลิเมอร์จากการใช้อะซิเตทร่วมกับกรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนร่วม	62
8.	ค่า Yeild ของพอลิเมอร์จากการใช้อะซิเตทร่วมกับกรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนร่วม	68
9.	ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตพอลิเมอร์ภายในเซลล์	70
10.	อุณหภูมิหลอมเหลว และอุณหภูมิแข็งตัวของผลึกของพอลิเมอร์	94
11.	สเปคตรัมที่เกิดขึ้น และ wave number ของหมู่ฟังก์ชันนัลที่ดูดกลืนแสงจากพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดและทำบริสุทธิ์จาก *R. sphaeroides* U7	96
12.	ค่า chemical shift และ peak number (วิเคราะห์ด้วย 500 MHz ^{13}C-NMR) ของพอลิเมอร์บริสุทธิ์จาก *R.sphaeroides* U7 สำหรับพิจารณาอะตอมของคาร์บอนในแต่ละมอนอเมอร์ที่ต่อกันในโครงสร้างของพอลิเมอร์	106

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิเบต้าไฮดรอกอัลคาโนเอท และการเรียกชื่อ	6
2.	ลักษณะของ *pha*CBA cluster	7
3.	วิถีการสังเคราะห์สารพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต	8
4.	ลักษณะ PHA granule ภายในเซลล์	11
5.	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)	11
6.	วิถีการสังเคราะห์ PHB และ PHBV	12
7.	วิถีการผลิต Propionyl-CoA จากกรดอะมิโน threonine	13
8.	ปริมาณเซลล์และ PHB ที่ผลิตได้ เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกันของเชื้อ *Alcaligenes latus* ATCC 29713	21
9.	สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสง	44
10.	ลักษณะเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ ES16, N20 และ U7	45
11.	ความสัมพันธ์ของสายพันธุ์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ N20 และ U7 ในลักษณะของ Phylogenetic tree เทียงเคียงกับแบคทีเรียกลุ่ม Proteobacteria ประเภท alpha subdivision	50
12.	ลักษณะเซลล์ที่ติดสี Sudan black (a) สายพันธุ์ ES16, (b) สายพันธุ์ U7 และ (c) สายพันธุ์ N20	54
13.	ลักษณะของ PHA granule ภายในเซลล์	55
14.	การเจริญและปริมาณ PHA จากการเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* ES16, N20 และ U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกลูทาเมท-อะซิเตท (GA medium) ในสภาวะให้อากาศ-ไร้แสง (200 รอบต่อนาที) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส	56
15.	ผลของกรดวาเลอริกที่เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมต่อน้ำหนักมวลเซลล์ และการผลิต PHAในระหว่างการเลี้ยง *Rhodobactr sphaeroides* N20 ในอาหารกลูตาเมท-อะซิเตท ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสงที่ 37°C	58
16.	ผลของกรดวาเลอริกที่เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมต่อน้ำหนักมวลเซลล์ และการผลิต PHAในระหว่างการเลี้ยง *Rhodobactr sphaeroides* U7 ในอาหารกลูตาเมท-อะซิเตท ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสงที่ 37°C	59

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17.	ผลของกรดโพรพิโอนิกที่เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมต่อน้ำหนักมวลเซลล์ และการผลิต PHAในระหว่างการเลี้ยง *Rhodobactr sphaeroides* N20 ในอาหารกลูตาเมท-อะซิเตท ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสงที่ 37°C	64
18.	ผลของกรดโพรพิโอนิกที่เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมต่อน้ำหนักมวลเซลล์ และการผลิต PHAในระหว่างการเลี้ยง *Rhodobactr sphaeroides* U7 ในอาหารกลูตาเมท-อะซิเตท ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสงที่ 37°C	66
19.	ผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการเจริญและการผลิต PHA จากการเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* U7 บนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิ 37°C	74
20.	ผลของยีสต์สกัดต่อการเจริญและการผลิต PHA จากการเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกลูตาเมท-อะซิเตท ร่วมกับกรดวาเลอริกความเข้มข้น 40 mM พีเอชเริ่มต้น 7 ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง บนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	76
21.	สีของสารละลายเซลล์ *R. spaeroides* U7 ที่มีการเติมยีสต์สกัดต่างกันในอาหารเลี้ยงเชื้อกลูตาเมท-อะซิเตท ร่วมกับ กรดวาเลอริกความเข้มข้น 40 mM ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง บนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส	77
22.	ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญ ค่าพีเอช และการผลิต PHA จากการเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกลูตาเมท-อะซิเตท ร่วมกับ กรดวาเลอริกความเข้มข้น 40 mM ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง บนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส	79
23.	ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ ค่าพีเอช และการผลิต PHA จากการเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกลูตาเมท-อะซิเตท ร่วมกับ กรดวาเลอริกความเข้มข้น 40 mM ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7 ภายใต้สภาวะมีอากาศ ไร้แสง บนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที)	81

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
24.	ผลของสภาวะการเลี้ยงต่อการเจริญ ค่าพีเอช และการผลิต PHA จากการเลี้ยง *R. sphaeroides* U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกลูตาเมท-อะซิเตท ร่วมกับ กรดวาเลอริกความเข้มข้น 40 mM ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7 บ่มที่ 30 อุณหภูมิ	84
25.	ผลของอัตราการให้อากาศต่อการเจริญ และการผลิต PHA จากการเลี้ยง *R. sphaeroides* U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกลูตาเมท-อะซิเตท ร่วมกับ กรดวาเลอริกความเข้มข้น 40 mM ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	86
26.	ผลของการกวนต่อการเจริญ และการผลิต PHA จากการเลี้ยง *R. sphaeroides* U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกลูตาเมท-อะซิเตท ร่วมกับ กรดวาเลอริกความเข้มข้น 40 mM ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7 อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	88
27.	ผลของชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ต่างกันต่อปริมาณ PHA ที่สกัดได้	90
28.	โครมาโตแกรมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรกลูทาเมต-อะซิเตท ด้วย GC-MS	92
29.	โครมาโตแกรมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรกลูทาเมต-อะซิเตท ร่วมกับกรดวาเลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ด้วย GC-MS	93
30.	อินฟาเรดสเปคตรัมของพอลิเมอร์ทที่ได้จากการสกัดและทำบริสุทธิ์จาก *R. sphaeroides* U7	95
31.	รูปแบบที่เกิดขึ้นของพอลิเมอร์ที่สกัดได้จากเชื้อ *R. sphaeroides* U7 ในสารละลายคลอโรฟอร์ม ด้วยเครื่อง X-ray diffractometer	99
32.	ภาพถ่ายลักษณะตะกอน PHBV ที่ได้จากการสกัดและตกตะกอนด้วยเฮกเซนเมื่อเตรียมในคลอโรฟอร์มความเข้มข้นต่างกันด้วย scanning electron microscopy	101
33.	สเปคตรัมที่เกิดขึ้นของพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดและทำบริสุทธิ์จาก *R. sphaeroides* U7	103

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
34.	สเปคตรัมที่เกิดขึ้นของพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดและทำบริสุทธิ์จาก *R. sphaeroides* U7 ด้วยการใช้ 500 MHz ^{13}C-NMR สำหรับการบ่งชี้ถึงคุณลักษณะของพอลิเมอร์	104