รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ชนัญ ผลประไพ. 2537. สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพอลิบีต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต จาก *Alcaligenes* sp. สายพันธุ์ A-04 ในระดับถังหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เสาวรจน์ ช่วยจุลจิตน์. 2538. พอลิเมอร์ชายน์ เล่ม 1. ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รัตนศิริ มุฑิตากุล. 2538.การผลิตพอลิบีต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019ที่แยกได้ วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อัญชนา ศุรดิษจร. 2537. การสร้างพอลิ (3-ไฮดรอกซบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) โดย *Alcaligenes* sp. สายพันธุ์ A-04. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์. 2536. ลักษณะและการสร้างพอลิ-บีต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรต โดย *Alcaligenes* sp. สายพันธุ์ A-04. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

Abate, R., Ballistreri, A., and Montaudo, O. 1995. Separation and Structural Characterization of Cycle and operon Chain Oilgomers Products in the Partial of Microbial Poly (hydroxybutyrates). Macromolecules. 28 : 791-796.

Akiyama, M., Taima, Y., and Doi, Y.S. 1992. Production of Pol(3-yhydroxyalkanoates) by bacterium of the genus *Alcaligenes* utilizing lond-chain fatty acids.Appl. Microbiol. Biotechnol. 37 : 698-701.

Anderson, A.J. and Dawes, E.A. 1990. Qccerence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Microbiological Reviews. 54(4): 450-472.

Ballard,D.G.H, Holmes,P.A., and Senior, P.J.1987. Formation of polymer of Polyhydroxybutyric acid in bacterial cell and coparsion of the morphology of growth with the formation of polyethylene in the solid state. In.M.Fontanile and A. Guyot (ed.) Recent advance in mechanistic ans synthetic aspects of polymerization. 215 : 239 –314.

Beaulieu, M., Beaulieu,Y., Melinard, J., Pandian, S. and Goulet, J. 1995. Influence of Ammonium Salts and Cane Molasses on Growth of *Alcaligenes eutrophus* and Production of Polyhydroxybutyrate. Appl. Environ. Microbiol. 165-169.

Bernfeld, F. 1955. Amylase, α and β In Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.(eds.) Method in Enzymology. Academic Press. New York. Vol.3 pp.149-150.

Bourgne, D.,Ouellette,B., Andra.Gand Grolean.,D. Production of poly-β- hydroxybutyrate from methnol characterization of new isolate of *Methylobacterium exterquens* . Appl.Microbiol. Biotechnol. 36 : 7-12.

Bluhm, Y.L., Hamer, G.K., Marchessault, R.H., Fyfe, C.A. and Veregin, R.P. 1986. Isodimorphism in bacterial poly(β- hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate). Macromolecules. 19 : 2871-2876.

Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W., and Fuller , R.C. 1990. Plastic from Bacteria and for bacteria : Poly (β - hydroxyalkanoates) as natural, Biocomatible, and Biodegrable Polyesters. Adv. Biochem. Eng. Biotechno. 41 : 77-93.

Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W., and Fuller , R.C. 1988. *Pseudomonas oleovorans* as a suorce of poly (β - hydroxyalkanoates) for potentail application as biodegredable polyesters. Appl. Microbiol. Biotechnol . 54 : 1977-1982.

Braunegg, G., Sonnleitner, B.,Lafferty, R.M. 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-β- hydroxybutyric in microbial biomass. Eu.J.Appl.Microbiol.Biotechnol. 6 : 29-37.

Bourque, D., Ouellette, B., Andre, G., and Groleau,D., 1992. Production of poly-3-hydroxybutyrate from methanol : characterization of a new isolate of *Methoylobacterium extorquens*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37 : 7-12.

Byrom,D. 1994. Polyhydroxyalkanoates, pp. 5-33. In: D.P. Mobley(ed.), Plastics from microbe : microbial of polymers and polyners precursors. Hanser Munich.

Chen, G.Q., Koing, K.H., and Lafferty, R.M. 1991. Occurrence of poly-(D)-3- hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus* . FEMS. Micrbiol.Lett. 84 : 173-176.

Chen, G.Q.,and Page,W.J. 1994. The effect of substrate on the molecular weight of poly-β-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter vinelandii* UWD. Biotechno.Lett.16 :155-160.

Cho, K.S., Ryu, H.W., Park, C.H.,and Goodrich, P. 1997. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from swine waste liquor by *Azotobacter vinelandii* Biotechnol. Lett. 19 : 7-10.

Comeau, Y., Hall, K.J., and Oldhm, W.K. 1988. Determination poly-β- hydroxybutyrate and poly-β-hydroxyvalerate in activated sludge by ges- liquid chromatography . Appl. Environ.Microbiol. 54 : 2325-2327.

Cromwick, A.M., Foglia, T. and Lenz, R.W. 1996. The microbial production of poly (hydroxyalkanoates) from tallow. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46 : 464-469.

Dawes, E.A., Senior, P.J. 1973. The role and regulation energy reserve polymers in microogranisms. Adv. Microbiol. Physiol. 10 : 135-266.

Daniel. M., Choi,J. Kim,J.H. Lebeault. 1992. Effect of nutrient deficiency on accumulation and relative molecular weight of poly -β- hydroxybutyric acid by methylotrophic bacterium *Pseudomonas* 135. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37 : 702-706.

Doi, Y., and Kunioka, M., Nakamura, Y. and Soga, k. 1987. Biosynthesis of copolymer in *Alcaligenes eutrophus* H-16 from 13C-labelled acetate and propionate. Mcromoleccules. 20 : 2988-2991.

Doi, Y., Tamaki, A., Kunioka, M. and Soga, k. 1988. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxtvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric acid and pentanoic acids. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28 : 330-334.

Doi, Y. (ed) 1990. Microbial Polyesters. VCH. New York.

Doi, Y., Segawa, A., Nakamura, S. Kunioka ,M. 1992 . IN : Dawes EA.(ed.) Novei biodegradable microbiol polymers. , 2rd.edn. Kluwer Academic Publishers, Dordercht,pp37-48

Doi, Y. Kitamanea, S.and Kideki, A. 1995. Micrbial synthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co- 3-hydroxyhexanoate) Macromolecules. 28 : 4822-4828.

Eggink, G., Smegen, J., Ongen- baysal, G. and Huijberts, G.N.M. 1992. Bacterial poly (hydroxyalkanoates).In Mathouth, M. (ed), Food packaging and preservation. pp.182-194.

Evan, D.J. and Sikdar. K.S. 1990. Biodegredable Plastic. Chemtech. 5 : 38-42.

Haywood, G.W. Anderson,A.J. and Dawes, E.A. 1989. A Survey of the accumulation of novel polyhydroxyalkanoates by bacteria. Biotechnol.Lett. 11 : 471-476.

Holmes, P.A. 1985. Application of PHB- a microbial produced biodegredable thermoplastic. Phys. Technol. 16 : 32-36.

Hori, K., Soga, K. and Doi, Y. 1994. Effect of culture conditions on molecular weight of poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas putida* from octanoate. Biotechnol. Lett. 16 : 709-714.

Huffman, G.L., and Keller, D.J. 1973. The plastic issue. In:Guillet J.(ed) Polymer and Ecological Problems . Plenum. New York. London. p155.

Hu, W.F., Cua, H. and Yu, P.H.F. 1997. Synthesis of poly(3- hydroxybutyrate-co- 3-hydroxyvalerate) from activacted sludge. Biotechnol. Lett. 19 : 695-698.

Hassan, M.A., Shiral,Y., Kusubayashi, N., and Hashimoto, K. 1996. Eeffect of organic acid profile during anaerobic treament of palm oil mill effuent on the production of poly hydroxyalkanoates by *Rhodobacter sphaeroides* . J. Ferment. Bioeng. 82 : 151-156.

Huijberts,G.N.M.,Eggink,G. 1996. Production of poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas putida* KT2442 in continuous cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46:223-239

Ishihara.Y., Shimizu. H.,and Shioya. S. 1996. Mole fraction control of poly(3- hydroxybutyrate-co- 3-hydroxyvalerate) acid in fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus*.Appl. Microbiol. Biotechnol 81 : 422-428.

Jendrossek, D.,Schirmer, A., Schlegel,H.G., 1996. Biodergradation of polyhydroxyalkanoic acids Appl.Microbil Biotechnol. 46:451-463.

Kato, M., Bao,H.J, Kang, C.K.,Fukui,y., and Doi,Y. 1996. Production of a novel of 3 – hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by *Pseudomonsa* sp. 61-3 from sugar. Appl.Microbiol.Biotechnol. 45 : 363-370.

Kemper, A.J. 1974. Determination of sub- micro quantities of ammonium and nitrate in soils with phenol, sodium nitropusside and hypochloride. Geoderma. 12 : 201-206.

Kofronva,O., Ptackkova.,L., and Chaloupka,J. 1994. Poly(3- hydroxybutyrate) granules of *Bacillus megaterium* . FoliaMicrobiol. 39 : 166-167.

Kusaka, S., Abe, H., Lee. S.Y. and Doi , Y. 1997. Molecular mass of poly (R)-3-hydroxybutyric produced in a recombinant *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47 : 140-143.

Lee, K.T., Kim, J.Y., Rhe,Y.H.,Bae.,K.S.,and Kim, Y.B. 1995. Biosynthesis of Poly -β - Hydroxyalkaoates by *Bacillus theringiensis* R-510. J. Microibol. 33 : 59-65.

Lee, S.Y. 1996a. Review Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Biotechnol Bioeng. 49 : 1-14.

Lee, S.Y. 1996b. Review : Plastic bacterial ? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. Tibtech. 14 : 431-438.

Lee, S.Y., Hyun, Y., Kim, T. W., Park, J.S. and Huh, T.L. 1996. Effect of the supplement of metabolites on cell growth and poly -β- hydroxybutyrate biosynthesis of *Alcaligenes latus*. J. Microbiol. Biotechnol. 6 : 120-127.

Kim,SW.,Kim,Pil.,Lee HS., and Kim,JH.,1996. High Production of Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) from Methylobacterium organophilum under Potassium Limitation. Biotechnol. Lett. Volume 18 No.1 25-30.

Lemoigne, M. 1926 . Production of dehydration and polymerization of β - hydroxybutyric acid Bull. Soc. Chem. Biol. 8 : 770-782.

Leversuch, R. 1987. Industry weight the need to make polymer degradeble. Mold. Plastics. 134 : 239-248.

Leeuwan, M.A., Loodrecht, J,J., and Heijnen, M.C.M. 1997. Kinetic modeling poly (β-hydroxybutyrate) production and consumption by *Paracoccus pantotrophus* under dynamic substate supply. Biotechnol. Bioeng. 55 :774-782.

Lee.,In Young.,Stegantseva.Ellen M.,Savenkova,Ludmila.,and Young Hoon Park.,1995.Effects of Nitrosen and Oxygen Supply on Production of Poly-3-Hydroxybutyrate in Azotobacter chroococcum, J. Microbiol. Biotechnol. 5 : 100-104

Oeding, V. and Schlegel, H.G. 1973. β - krtothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H-16 and its sinificance in the regulation of poly β - hydroxybutyrate metabolism. Biochem. J. 134 : 239-248.

Ostle, A.G., and Holt, J.G. 1982. Nile bule a as a fluorescent strain for poly -β- hydroxybutyrate. Appl.Environ Microbiol. 44 : 238-241.

Ogran, S.J., and Barham,P.1986 . β-ketithiolase from *Hydrogenomonsa eutropha* H-16 and its sinificance in the regulation of poly β - hydroxybutyrate metabolism . Biochem.J. 134 : 239-248.

Page, W.J.1989. Production of poly -β-hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD during growth on molasses and other complex carbon sources. Appl. Microbiol.Technol 31 : 329-333.

Page, W.J. 1992. Production of poly -β-hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD. the media containing sugar and complex nitrogen sources. Appl. Microbiol.Technol. 1992 . 38 : 117-121.

Page, W.J. and J. Manchak. 1994. Control of polyhydroxyalkanoate synthesis in the *Azotobacter vinelandii* . Appl. Microbiol.Technol 88 : 60-71.

Page, W.J. and J. Manchak. 1997. The role of β- oxidation of short-chain alkanoates in polyhydroxyalkanoate copolymer synthesis in *Azotobacter vinelandii* . Can.J. Microbiol. 41 : 106-114.

Page, W.J., Bhanthumnavin, N., and Manchak, J. 1997. Production of poly(β-hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) copolymer from sugars by *Azotobacter salinestris.* Appl. Microbiol.Technol. 1997. Appl. Microbiol.Technol . 48 : 88-93.

Ramasy, B.A., Lomaliza, k., Chavarie,C., and Bataille,P., 1990. Production of Poly(β-hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate). App. Environ. Microbiol. 56 : 2093-2098.

Rapaske,R., Abe, H., Lee. S.Y. and Doi , Y. 1976. Quantitative requirement for exponential growth of *Alcaligenes eutrophus.* Appl.Environ.Microbiol. 32 : 585-591.

Renner,G.,Haage,G.,Braunegg,G.,1996. Production of short-side-chain polyhydroxyalkanoates by various bacteria from the rRNA superfamily III

Qungliano, J.C., and Miyazaki, S.S. 1997. Effect of aeration and carbon/nitrogen ratio on the molecular mass of the biodegradeble polymer β-hydroxybutyrate obtained from *Azotobacter chroococcum* 6B. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48 : 662-664.

Sclegel , H.G., Gottschalk,G., and Bartha, R. 1961. Formation utillzstion of PHB by Knallas bacteria. Nature. 191 : 463-465.

Steinbuchel, A. and Sehlegel, H.G. 1991. Micro review : Physiology and molecular genetics of poly (β - hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus* . Mol. Microbiol. 5(3) : 535-542.

Steinbuchel, A., Husted, E., Liebergesell, M., Pieper, U., Timm, A., Valentin, H. 1992. Molecular basis for biosynthesis and accumulation of hydroxyalkanoic acid in bacterial FEMS. Microbiol. Rev. 103 : 217-230.

Steinbuchel, A., and Pieper. 1992. Production of copolyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvalerate by a mutant of *Alcaligenes eutrophus* . 37 : 1-6'

Son.H.,and Lee. S. 1996. Biosynthesis of poly(3- hydroxybutyrate-co- 3-hydroxyvalerate) from structurally unrelated singel carbon sources by newly isolated *Pseudomonas* sp.EL-2. Biotechnol. Lett.10 : 1217-1222.

Soon, H., Park., and Lee, S. 1996. Growth-Associated production poly-β- hydroxybutyrate from glucose or alcholic distillery wastewater by *Actinobacillus* . sp. EL-9. Biotechnol. Lett 18 : 1229-1234.

Suzuki. T., Yamane,T., and Shimisu, S. 1986. Mass production of poly -β-hydroxybutyric acid by fed-batch culture with controlled carbon/nitrogen feeding. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24 : 370-374.

Suzuki, T., Deduchi,H. Yamane,T., Shimizu, S., and Gekko,k., Control molucular weight of poly-3- hydroxybutyric acid produced in fed-batch culture of *Protomonas extorquens*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27 : 487-491.

Suzuki, T, Miyake ,S .,Tokiwa,Y., 1996. A recombinant cyanobacteruim that accumulate poly-β-hydroxybutyrate. Biotechnol.Lett. 18 : 1047-1050.

Takeda, M., Matsuoka H., Hamana , H., and Hikuma, M. 1995. Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate by *Sphaerotilus natans* . Appl. Microbiol. Biotechnol. 43 : 31-34.

Taylor, I.J., and Antholy, C. 1986. Acetyl-Co-A production and utilliztion during growth of the facultative methylotroph *Psedomonas* AM 1 on ethanol , malonate and 3-hydroxybutyrate . J. Gen . Microbiol. 95 : 134-145.

Taidi, B.,Anderson,A.J. Dawes, E.., and Byrom,D. 1994. Effect of carbob suorce and concentratio on the molecular weight mass of poly(β- hydroxybutyrate) produced by *Methylobacterium extorquens* and *Alcaligenes eutrophus* .Appl.Microbiol.Biotechnol. 40 : 786-790

Valentin , H.E.,Lee,E.Y. and Steinbuchel , A. 1994. Identification of 4-hydroxyhexanates acids as new constituent of biosynthesis polyhydroxyalkanoic acids from bacteria. Appl.Microbiol. Biotechnol. 36 : 710-716.

Valentin,H.E.,Schonebaum,A.,Steinbuchel,A. 1996.Identification of 5-hydroxyhexanoic acid,4 -hydroxyheptanoic acid and 4-hydroxyoctanoic acid as new constituents of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. Appl.Microbiol. Biotechnol. 46:261-267

Wallen, L.L, Rohwedder, W.K. 1974. Polyhydroxyalkanoate from activated sluge .Environ.Sci.Tcchnol. 8 : 576-579.

Williams , D.R., Anerson,A.J., Dawes, E.A. and Ewing. D.F. 1994. Production of copolyester-hydroxybutyrate-co- 3-hydroxyvalerate from succinic acid by *Rhodocuccus ruber* : biosynthesis consideration . Appl.Micribiol.Biotechmol. 40 : 717-723.

Yim, K.S., Lee, S.Y., and Chang, H.N. 1996. Synthesis of poly(3- hydroxybutyrate-co- 3-hydroxyvalerate) by recombinant *Escherichia coli.* Biotechnol.Bioeng. 49 : 495-503.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมกราฟมาตรฐาน และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. การเตรียมกราฟมาตรฐานระหว่าง OD_{600} กับน้ำหนักเซลล์เปียก และ OD_{600} กับน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ของ *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

เตรียมหัวเชื้อของ *Bacillus* sp. BA-019 ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น โดยวัดค่า OD_{600} = 0.70 นาโนเมตร ถ่ายเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร (2% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) เลี้ยงเชื้อจนได้อายุที่ต้องการ ตวงน้ำหมักปริมาตร 10 20 40 60 และ 80 มิลลิลิตร ปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำเซลล์มากระจายในน้ำกลั่นปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำแต่ละตัวอย่างมาเจือจางให้ได้ค่า OD_{600} ในช่วง 0.1 – 0.6 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลอง ปิเปตตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร กรองผ่านเมมเบรน 0.45 ไมครอนที่ทราบน้ำหนักเปียกและแห้งแล้ว นำมาชั่งหาน้ำหนักเซลล์เปียก (กรัมต่อลิตร) แล้วนำไปอบแห้งจนน้ำหนักคงที่ เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) นำค่าที่ได้สร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง OD_{600} กับน้ำหนักเซลล์เปียก (กรัมต่อลิตร) และ OD_{600} กับน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

2. การเตรียมกราฟมาตรฐานระหว่าง OD_{600} กับน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ของ *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับเพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ (MSM)

ถ่ายเชื้อ *Bacillus* sp. BA – 019 จากอาหารสำหรับเตรียมกล้าเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร (2% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ตวงน้ำหมักปริมาตร 10 20 40 60 และ 80 มิลลิลิตร ปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำเซลล์มากระจายในน้ำกลั่นปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำแต่ละตัวอย่างมาเจือจางให้ได้ค่า OD_{600} ในช่วง 0.1 – 0.6 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลอง ปิเปตตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร กรองผ่านเมมเบรน 0.45 ไมครอนที่ทราบน้ำหนักแห้งแล้ว นำไปอบแห้งจนน้ำหนักคงที่ เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) นำค่าที่ได้สร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง OD_{600} กับน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

3. วิธีเตรียมสารละลายกรดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA reagent)

โดยละลาย 1.0 กรัมของกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมโปแตสเซียมโซเดียมตาร์เตรต 30.0 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นเก็บในขวดสีชา

4. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย

1. สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์

โปแตสเซียมคลอไรด์ 150 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร

2. สารละลายฟีนอลไนโตรพัสซายด์

ละลายฟีนอล 7 กรัม และโซเดียมไนโตรพัสซายด์ 34 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุ 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายบัฟเฟอร์ไฮโปรคลอไรด์

นำโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1,480 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดประจุ 70 มิลลิลิตร แล้วเติมโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 4.98 กรัม และ โซเดียมไฮโปรคลอไรด์ (ความเข้มข้น 5 - 5.25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปรับ pH 11.4 – 12.2 ด้วยโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

4. สารละลาย EDTA

ละลาย EDTA 6 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุ 80 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 และปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

สูตรคำนวณ

1. การคำนวณน้ำหนักเซลล์เปียก (กรัมต่อลิตร)

สูตร น้ำหนักเซลล์เปียก (กรัมต่อลิตร) = ความชัน × OD_{600} × ค่าการเจือจาง

2. การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

สูตร น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) = ความชัน × OD_{600} × ค่าการเจือจาง

3. การคำนวณปริมาณฟรุกโตสในอาหาร (กรัมต่อลิตร)

สูตร ปริมาณฟรุกโตส (กรัมต่อลิตร) = ความชัน × OD_{540} × ค่าการเจือจาง

4. การคำนวณปริมาณแอมโมเนียมในอาหาร (กรัมต่อลิตร)

สูตร ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร) = ความชัน × OD_{630} × (1/1000)
(ค่าการเจือจาง/5) × (132/28)

5. การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ (กรัมต่อลิตร) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตรกราฟี

การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ของ 3 HB และ 3HV (กรัมต่อลิตรต่อ lyophilized cell 0.02 กรัม) ทำการประมวลผลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Star chromatogram : Version 4.02 ซึ่งจะทำการคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ (กรัมต่อลิตร) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในสภาวะเดียวกัน

การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์แต่ละชนิด (กรัมต่อลิตร)

$$\text{ปริมาณโมโนเมอร์ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าจากการวิเคราะห์ (กรัมต่อลิตร)} \times \text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)}}{20 \times 1.10}$$

หมายเหตุ ค่าคงที่ 1.10 คือ correlation factor ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งโดยการอบต่อน้ำหนักเซลล์แห้งโดยการระเหิดแห้งภายใต้สภาวะสูญญากาศ

(cell dry weight = lyophilized weight × 1.10)

5. การคำนวณสัดส่วน (โมลเปอร์เซ็นต์) ของแต่ละโมโนเมอร์ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี

สูตร การคำนวณสัดส่วนองค์ประกอบของโมโนเมอร์ในโคพอลิเมอร์ (mole fraction)

1. คำนวณหาปริมาณของแต่ละโมโนเมอร์ (กรัมต่อลิตร)

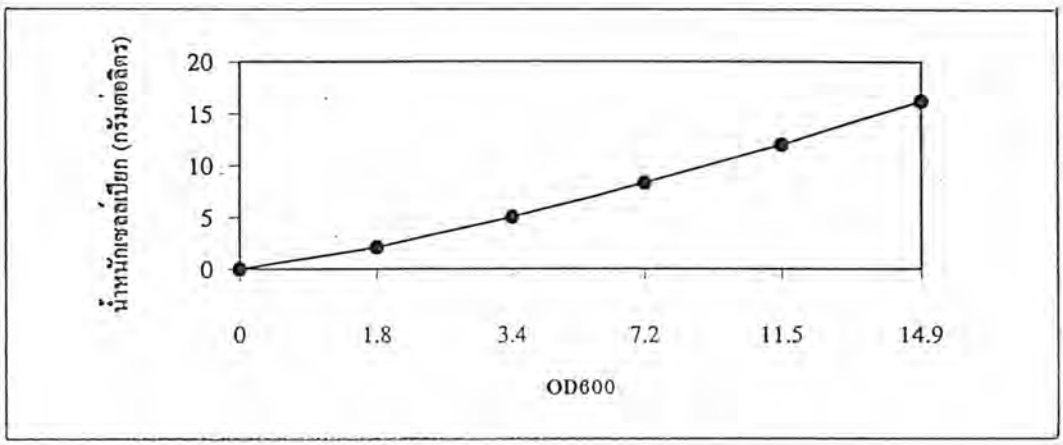
2. คำนวณหาจำนวนโมลของแต่ละโมโนเมอร์ โดยการหารด้วยน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละโมโนเมอร์ (น้ำหนักโมเลกุล ของ 3 HB และ 3HV = 86 100 ตามลำดับ)

3. คำนวณหาสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) ดังนี้

$$\text{โมลเปอร์เซ็นต์ของแต่ละโมโนเมอร์} = \frac{\text{จำนวนโมลของแต่ละโมโนเมอร์} \times 100}{\text{ผลรวมของจำนวนโมลของโมโนเมอร์ทั้งหมด}}$$

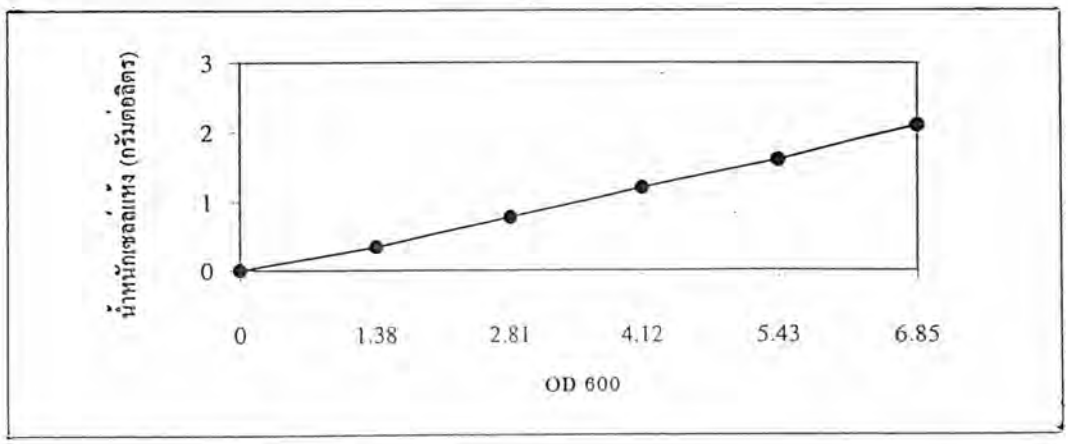
ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานระหว่าง OD 600 กับ น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)



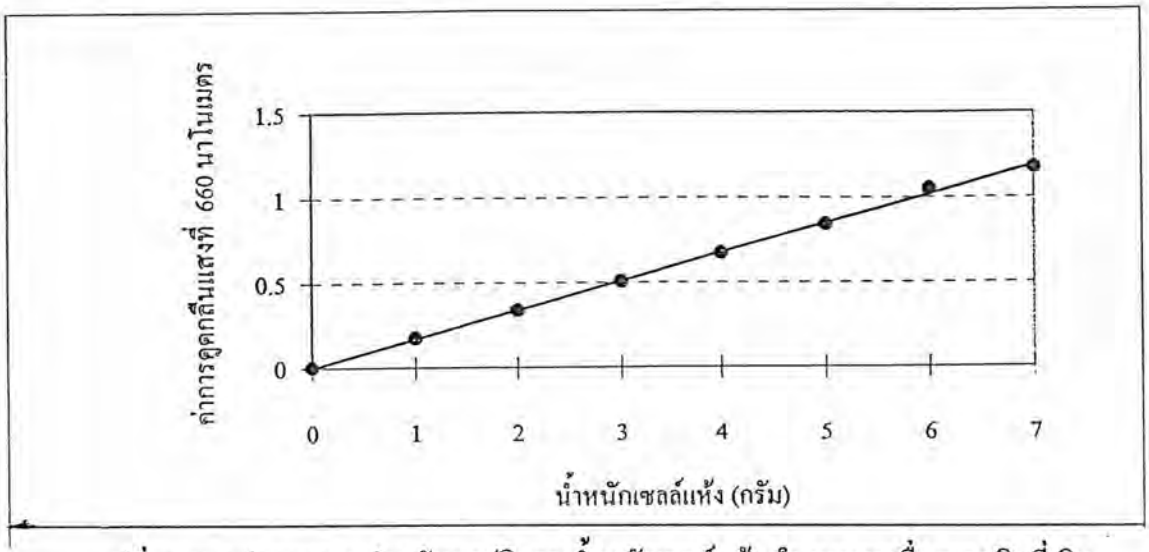
รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
ค่าความชัน เท่ากับ 1.55

2. กราฟมาตรฐานระหว่าง OD 600 กับ น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)



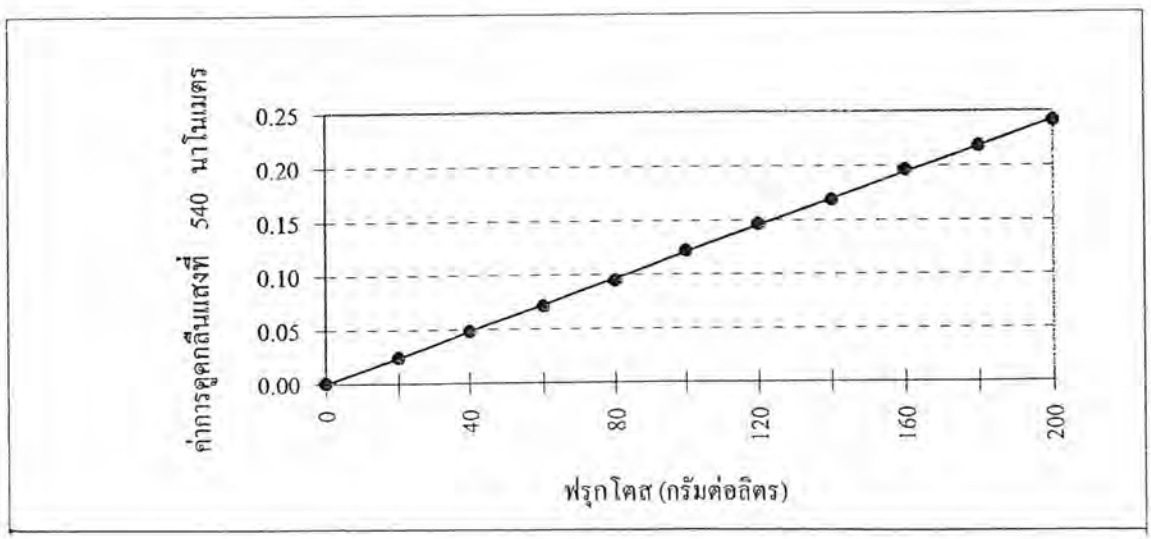
รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
ค่าความชัน เท่ากับ 0.2727

3. กราฟมาตรฐานระหว่าง OD_{600} กับน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) (อาหารเพื่อการผลิตที่เติมกากน้ำตาล)



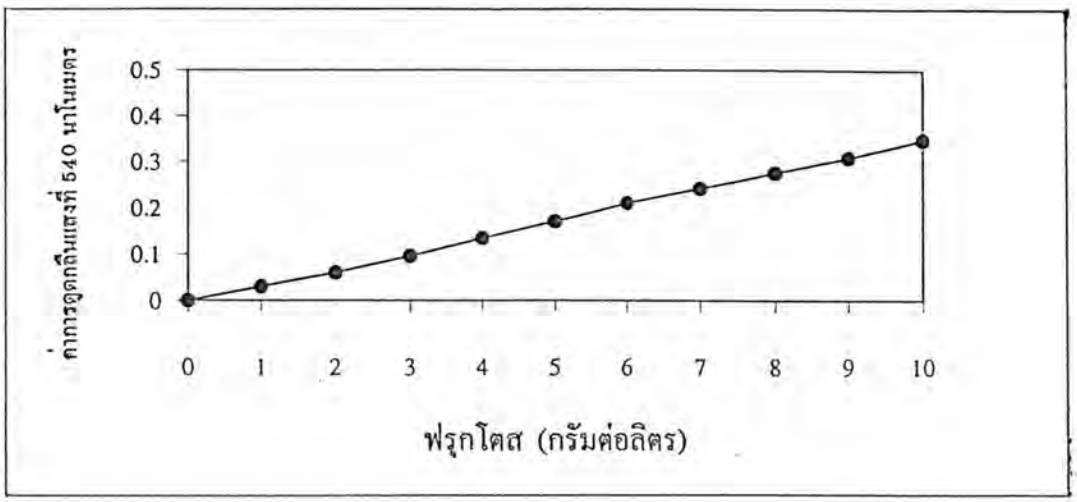
รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ในอาหารเพื่อการผลิตที่เติมกากน้ำตาล ความชันเท่ากับ 0.153

4. กราฟมาตรฐานของฟรุกโตส (food grade) ด้วยวิธี DNSA



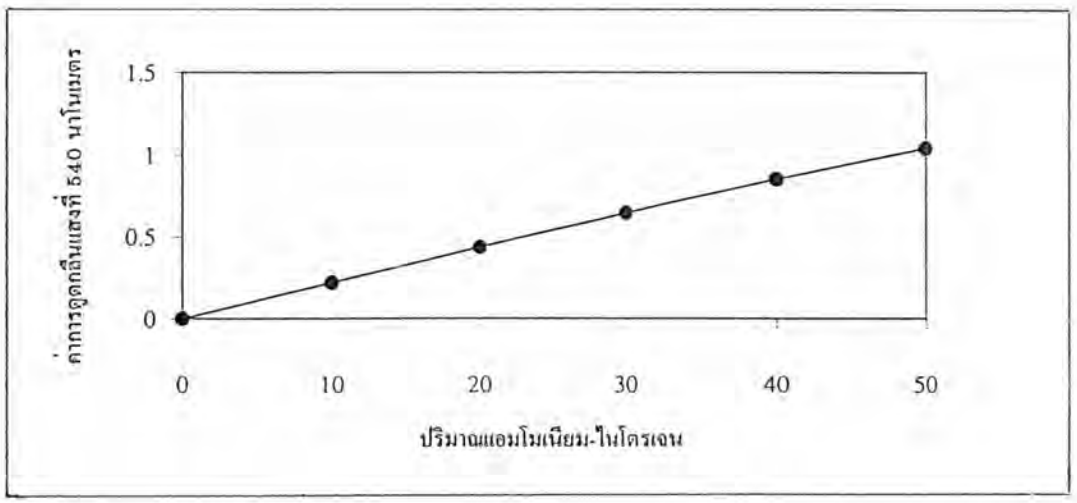
รูปที่ 4 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมานฟรุกโตสในช่วงความเข้มข้น 0-10 มิลลิกรัม ความชันเท่ากับ 5.38×10^{-4}

5. กราฟมาตรฐานของ ฟรุกโตส (analytical grade) ด้วยวิธี DNSA



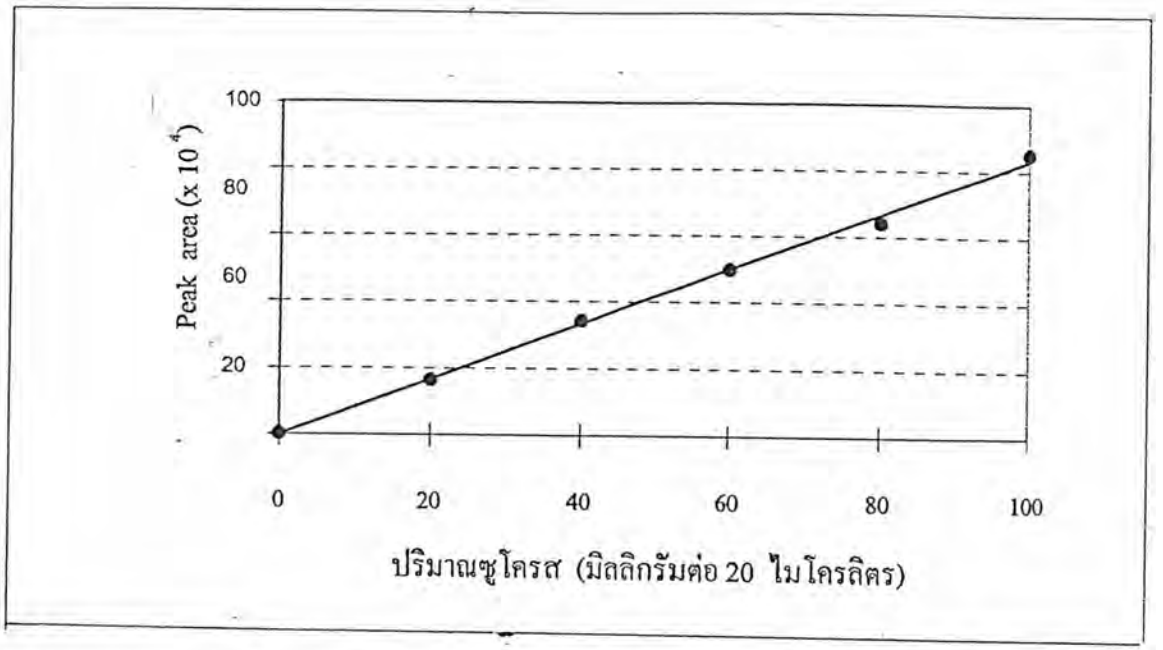
รูปที่ 5 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณฟรุกโทสในช่วงความเข้มข้น 0-10 กรัมต่อลิตร ค่าความชัน เท่ากับ 5.5×10^{-4}

6. กราฟมาตรฐานของ แอมโมเนียม-ไนโตรเจน

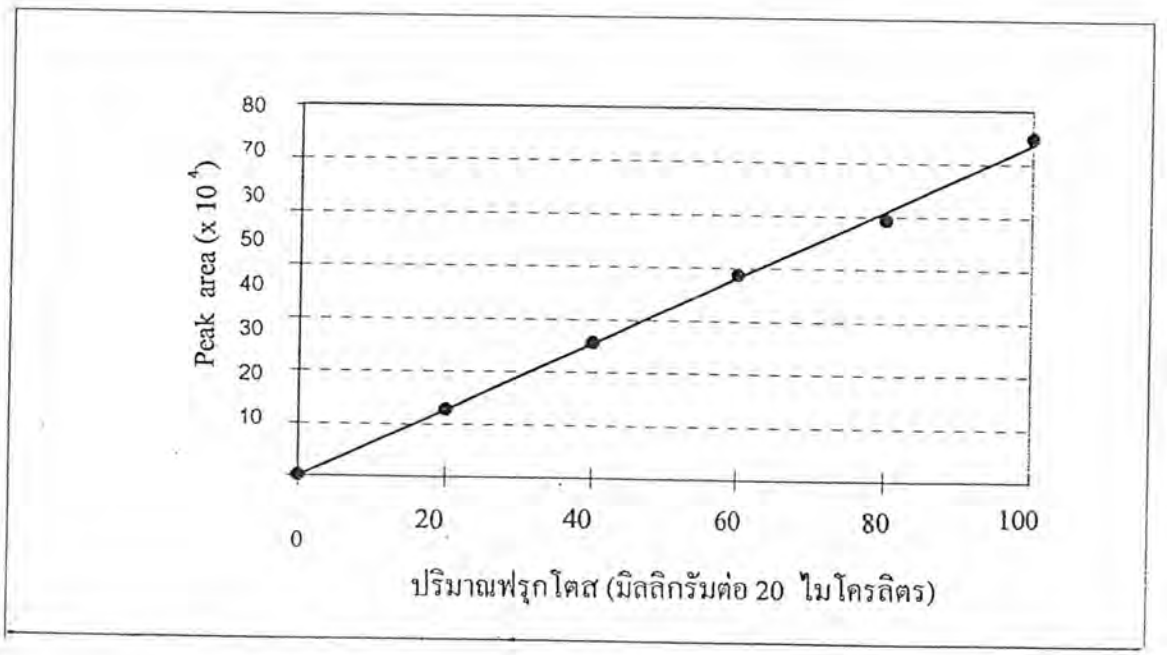


รูปที่ 6 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ในช่วงความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

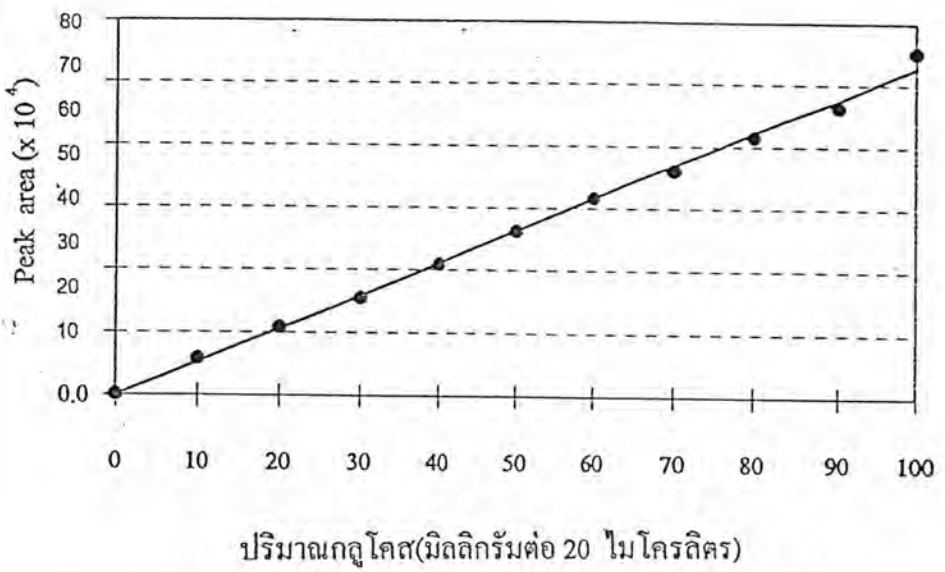
ค่าความชัน เท่ากับ 0.025



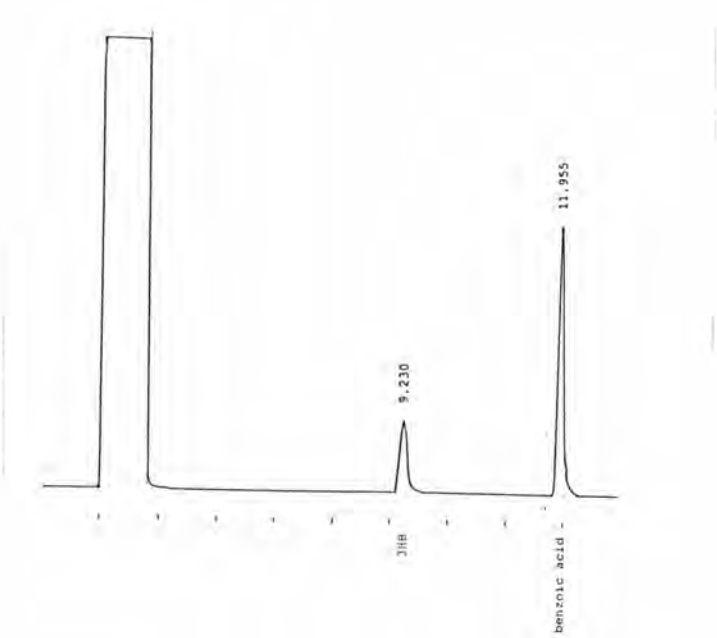
รูปที่ 7 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณซูโครสที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ความชันเท่ากับ 6.55×10^{5}



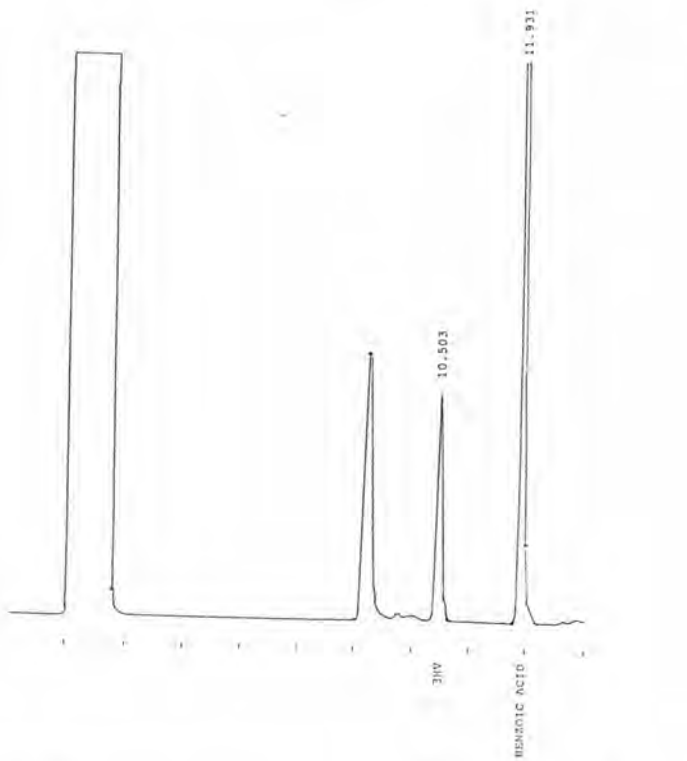
รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณฟรุกโตสที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ความชันเท่ากับ 6.93×10^{5}



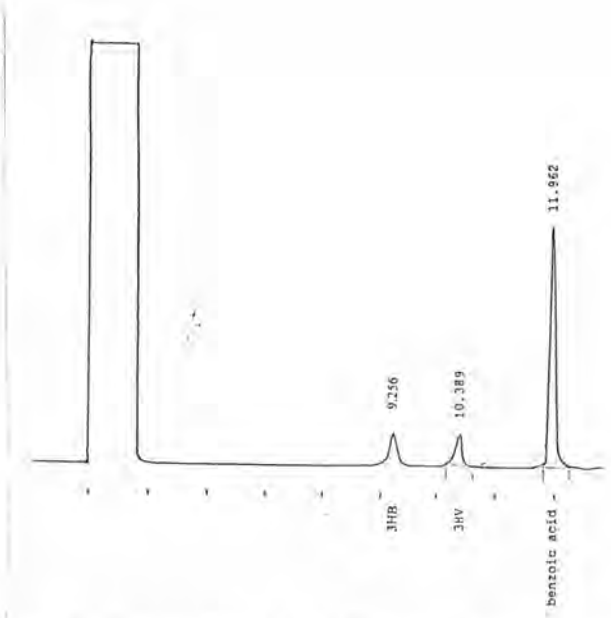
รูปที่ 9 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณกลูโคสที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ความชันเท่ากับ 6×10^{4}



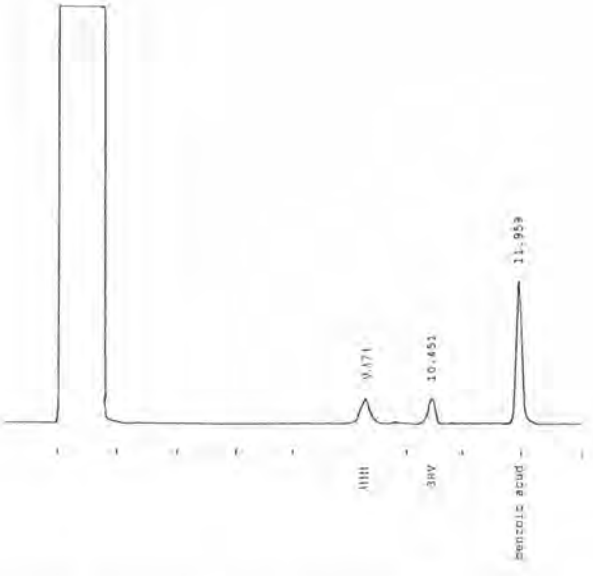
รูปที่ 10 โครมาโตแกรมสารมาตราฐาน 3HB ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC



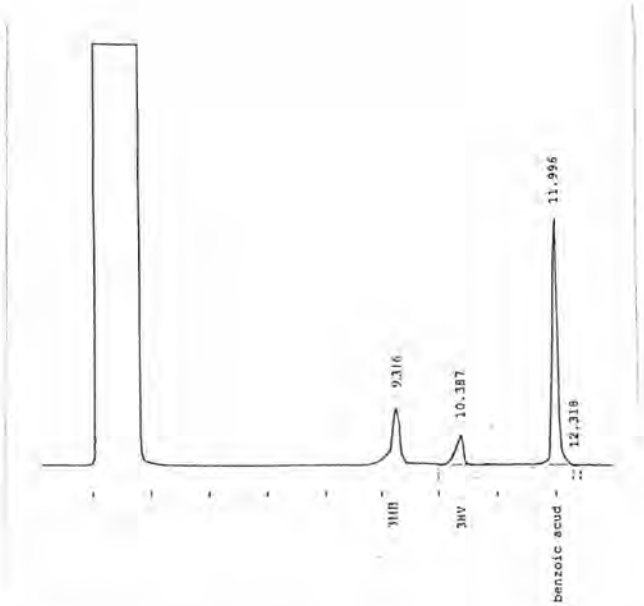
รูปที่ 11 โครมาโตแกรมสารมาตราฐาน 3HV ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC



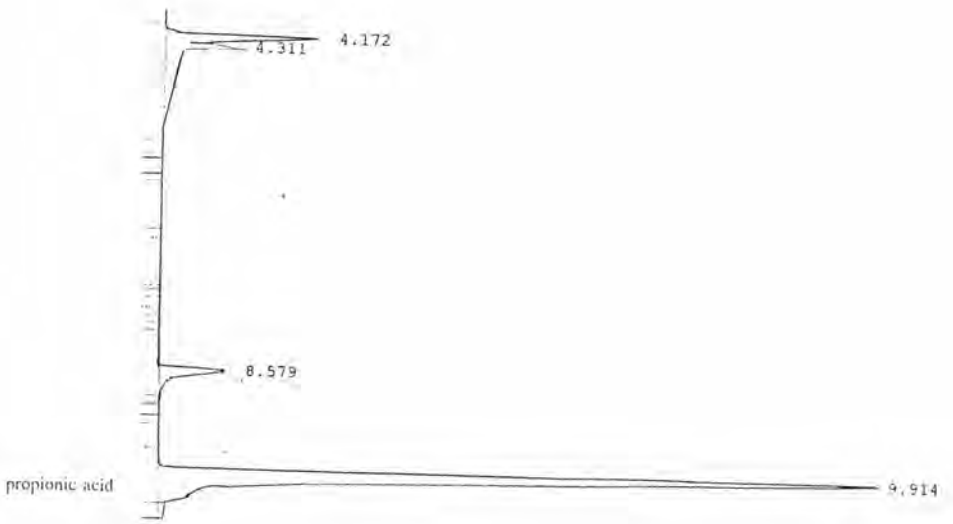
รูปที่ 12 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) จาก *Bacillus* sp.BA-019 ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลและกรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนวิเคราะห์ด้วยวิธี GC



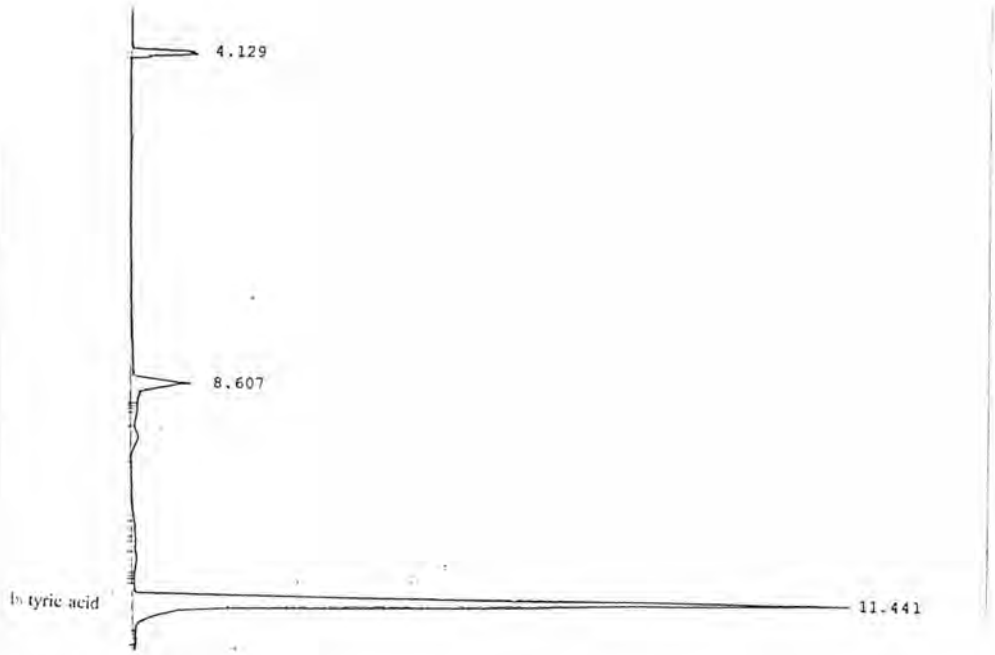
รูปที่ 13 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) จาก *Bacillus* sp.BA-019 ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลและกรดบิวทิริกเป็นแหล่งคาร์บอนวิเคราะห์ด้วยวิธี GC



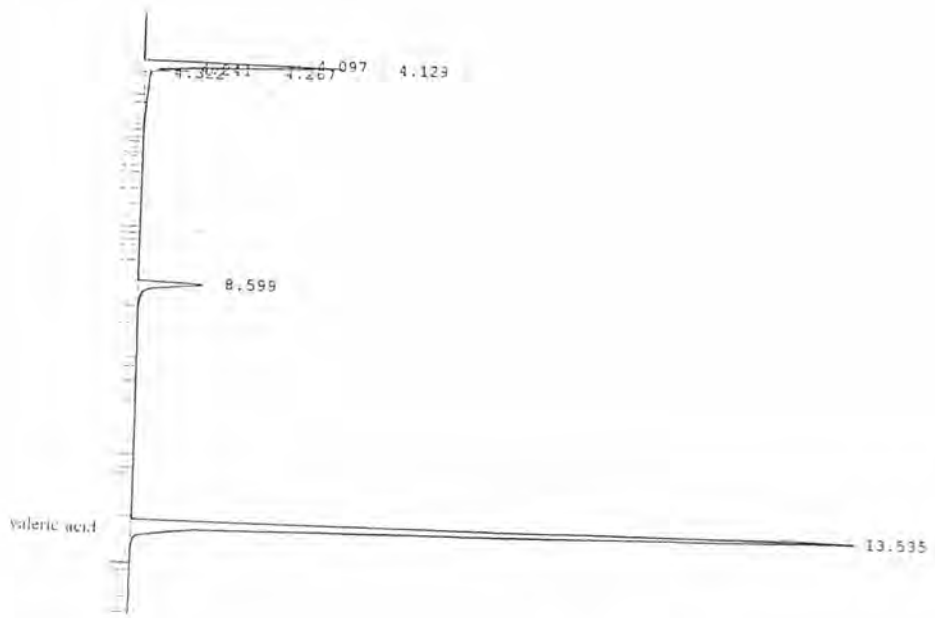
รูปที่ 14 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) จาก *Bacillus* sp.BA-019 ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลและกรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนวิเคราะห์ด้วยวิธี GC



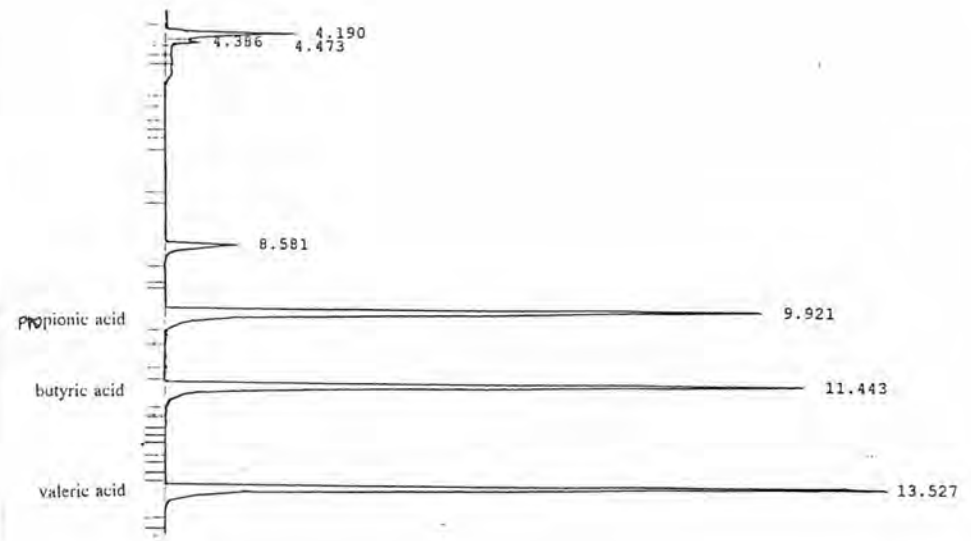
รูปที่ 15 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกรดโพรพิโอนิก ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC



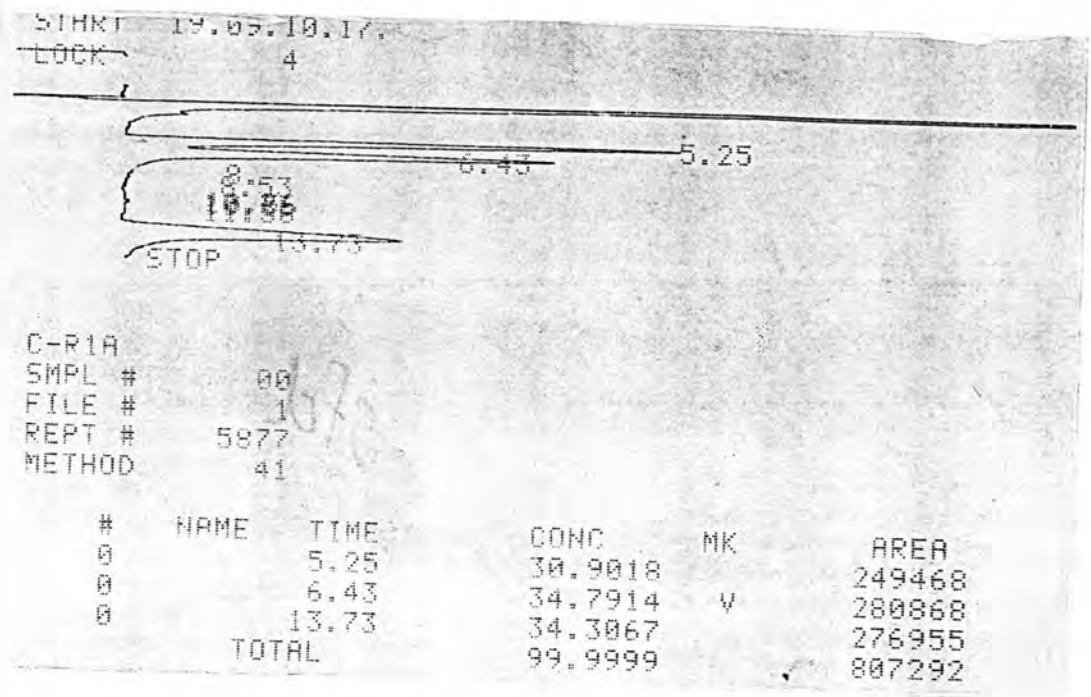
รูปที่ 16 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกรดบิวทิริก ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC



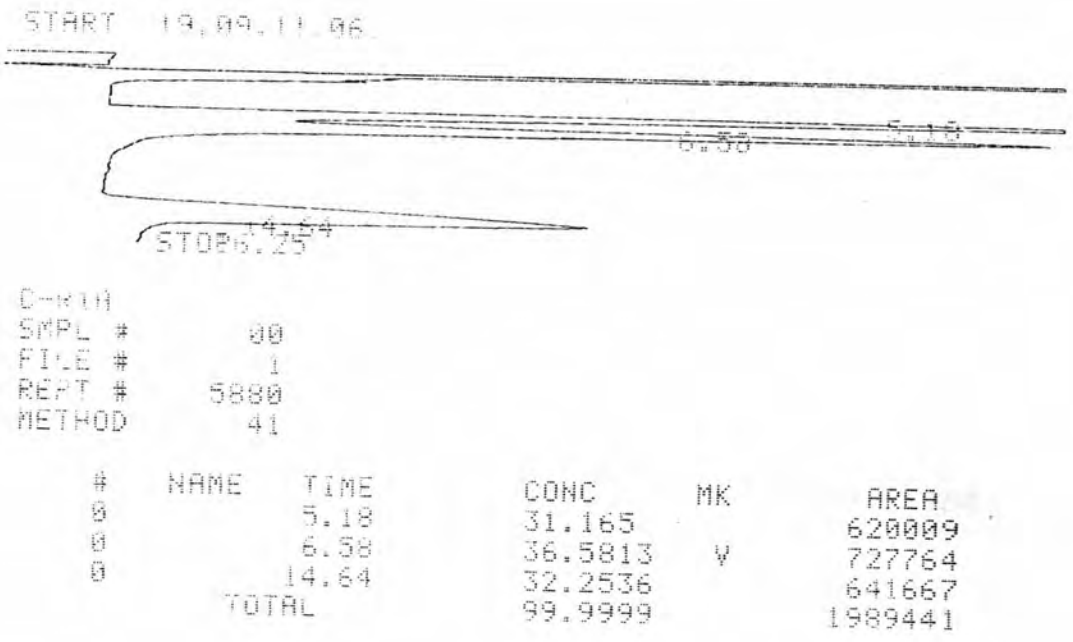
รูปที่ 17 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกรดวาเลอริก ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC



รูปที่ 18 โครมาโตแกรมของสารมาตราฐานทั้ง 3 ชนิด คือ กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก และกรดวาเลอริก ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC

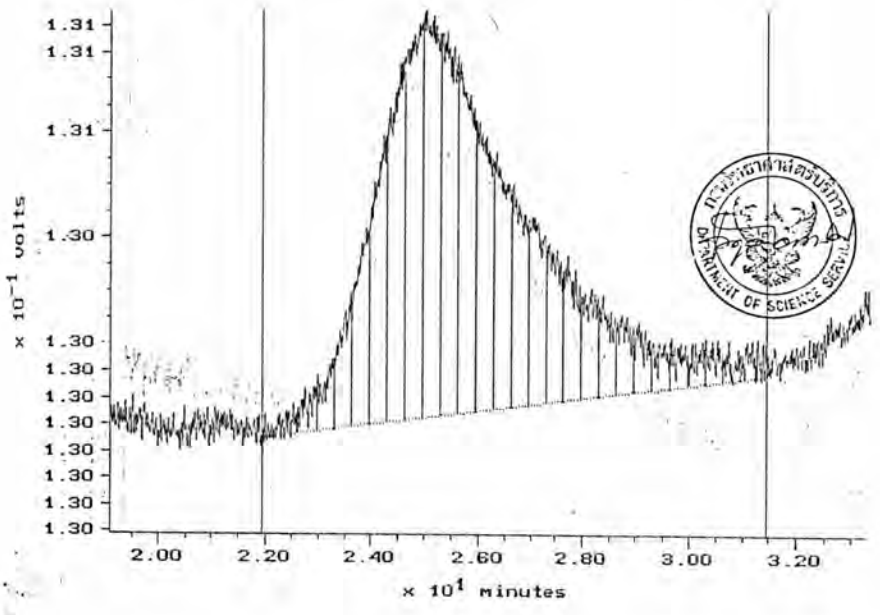


(ก)

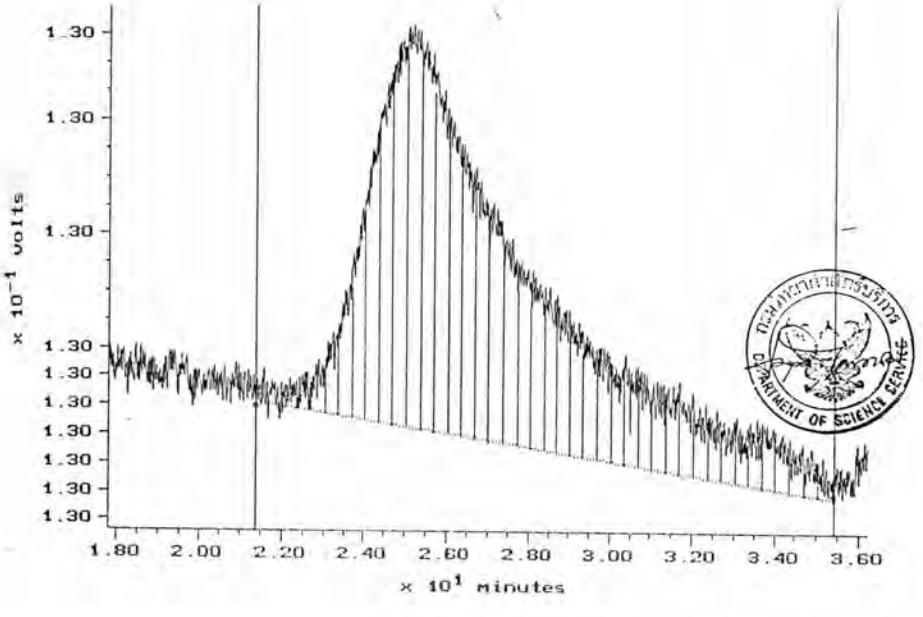


(ข)

รูปที่ 19 โครมาโตรแกรมของน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส มาตรฐาน (ก)
โครมาโตรแกรมของน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส จากกากน้ำตาล (ข)

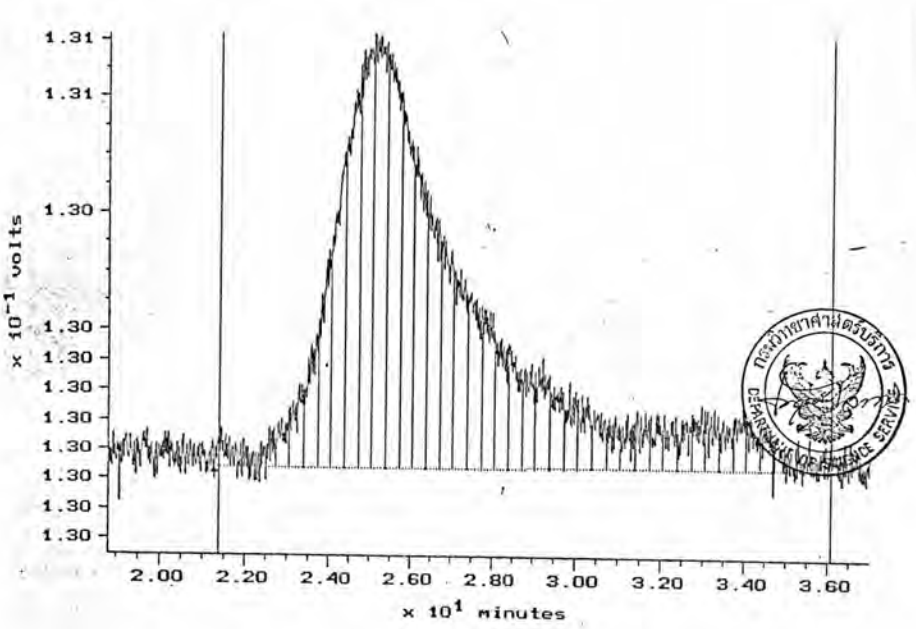


P (3HB-co-7%3HV)



P (3HB-co-13%3HV)

รูปที่ 20 โครมาโตรแกรมของโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) จาก *Bacillus* sp. BA-019 ที่มีสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์แตกต่างกัน ซึ่งวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยและค่า PDi ด้วยเครื่อง GPC



P (3HB-co-21%3HV)

รูปที่ 20 (ต่อ) โครมาโตรแกรมของโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) จาก *Bacillus* sp. BA-019 ที่มีสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์แตกต่างกัน ซึ่งวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยและค่า PDI ด้วยเครื่อง GPC

ประวัติผู้เขียน

นายพิสิษฐ คงกำเนิด เกิดวันที่ 6 กุมภาพันธ์ 2513 ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาตรบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อปีการศึกษา 2534 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2537