รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

พิสิษฐ คงกำเนิด. 2540. ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการเติบโตของ *Bacillus* sp. BA-019 และการผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รัตนศิริ มุทิตากุล. 2538. การผลิตพอลิบีต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* sp. BA-019 ที่แยกได้. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิรวิทย์ สิตปรีชา. 2541. ผลการกระตุ้นของกรดอะมิโน กรดไขมัน และกรดอินทรีย์บางชนิดต่อการสังเคราะห์ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) โดย *Alcaligenes* sp.A-04 . วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม. กระทรวง วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม. 2542. รายงานสถานการณ์คุณภาพสิ่งแวดล้อม พ.ศ. 2540. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์วิฑูรย์การปก.

สุชาดา จันทร์ประทีป. 2537. การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) โดย *Alcaligenes* sp.A-04 . วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เสาวรจน์ ช่วยจุลจิตร์. 2540. พอลิเมอร์ ชายน์ เล่ม 1. ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อดิศักดิ์ หิรัญรัตนากร. 2541. การเพิ่มอัตราผลผลิต P(3HB-*co*-3HV) โดยวิธีการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 แบบกึ่งต่อเนื่องเพื่อให้มีความหนาแน่นเซลล์สูง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์. 2536. ลักษณะและการสร้างพอลิบีต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดย *Alcaligenes* sp.A-04. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อัญชนา ศุรดิษจร. 2537. การสร้างพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) โคพอลิเมอร์ โดย *Alcaligenes* sp.A-04 . วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Akiyama, M., Taima, Y., and Doi, Y. 1992. Production of poly(3-hydroxyalkanoates) by a bacterium of genus *Alcaligenes* utilizing long-chain fatty acids. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37:698-701.

Anderson, A. J., and Dawes, E. A. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiol. Rev. 54:450-472.

AOAC international. 1995. AOAC Official Methods of Analysis. Vol. 1. 16th ed. Virginia: USA. pp. 4-13 - 4-14.

Aragao, G. M. F., Lindley, N. D., Uribelarrea, J. L. and Pareilleux, A. 1996. Maintaining a controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *Alcaligenes eutrophus*. Biotechnol. Lett. 18: 937-942.

Bergey's Manual. 1986. Sneath, P. H. A. eds. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins. pp. 1104-1134.

Bernfeld, F. 1955. Amylase α and β. In Colowich, P.S. and Kaplan, O.N. (eds.), Method in Enzymology, p.149. London: Academic Press.

Bertrand, J. L., Ramsay, B. A., Ramsay, J. A., and Chavarie, C. 1990. Biosynthesis of poly-β-hydroxyalkanoates from pentoses by *Pseudomonas pseudoflava*. Appl. Environ. Microbiol. 56:3133-3138.

Bitar, A., and Underhill, S. 1990. Effect of ammonium supplementation on production of poly-β-hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* in batch culture. Biotech. Lett. 8:563-568.

Bloembergen, S., Holden, D. A., Bluhm, T. L., Hamer, G. K., and Marchessault, R. H. 1986. Study of composition and crystallinity of bacterial poly(β-hydroxybutyrate-*co*-β-hydroxyvalerate). Macromolecules. 19:2868-2871.

Bloembergen, S., Holden, D. A., Bluhm, T. L., Hamer, G. K., and Marchessault, R. H. 1987. Synthesis of crystalline β-hydroxybutyrate / β-hydroxyvalerate copolyesters by coordination polymerization of β-Lactones. Macromolecules. 20:3086-3089.

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.

Bormann, E. J., LeiBner, M, and Beer, B. 1998. Growth-associated production of poly (hydroxybutyric acid) by *Azotobacter beijerckii* from organic nitrogen substrates. Appl Microbiol Biotechnol. 49: 84-88.

Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W., and Fuller, R. C. 1990. Plastic from bactria and for bacteria : poly(β-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible and biodegrable polyesters. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 41:77-93.

Brandl, H., Bachofen, R., and Mayer, J. 1995. Degradation of applications of polyhydroxyalkanoates. Can. J. Microbiol. 41(suppl.1):143-153.

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

Braunegg, G., Lefebvre, G., and Genser, K. F. 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyester from renewable resources: physiological and engineering aspects. Journal of Biotechnology. 65: 127-161.

Byrom, D. 1987. Polymer synthesis by microorganisms : technology and economics. Tibtech. 5:246-250.

Chang, H. N., Kim, Y. C., Lee, S. Y., and Kim, B. S. 1994. Current status of Biodegradable Plastics in Korea : Research, commercial production and government policy. Doi, Y. and Fukuda, K. (eds.), Biodegradable Plastics and Polymers. pp. 120-135. Elsevier Science B.V.

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

Chiellini, E. 1994. Status of government policy, regulation and standards on the issue of biodegradable plastic materials in Italy. Doi, Y. and Fukuda, K. (eds.), Biodegradable Plastics and Polymers. pp 273-281. Elsevier Science B.V.

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

Chung, Y. J., Cha, H. J., Yeo, J. S., and Yoo, Y. J. 1997. Production of poly(3-hydroxybutyric-*co*-3-hydroxyvaleric) acid using propionic acid by pH regulation. J. Ferment. Bioeng. 83(5) : 492-495.

Comeau, Y., Hall, K. J., and Oldman, w. k. 1988. Determination of poly-β-hydroxybutyrate in activated sludge by gas chromatography. Appl. Environ. Microbiol. 54:2325-2327.

Cox, M. K. 1994. Properties and applications of polyhydroxyalkanoates. Doi, Y. and Fukuda, K. (eds.), Biodegradable Plastics and Polymers. pp. 120-135. Elsevier Science B.V.

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

Dawes, E. A., and Senior, P. J. 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in microoganisms. Adv. Microb. Physiol. 10:203-266.

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

Doi, Y., Kitamura, S., and Abe, H. 1995. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate). Macromolecules. 28:4822-4828.

Doi, Y., Kunioka, M. Nakamura, Y., and Soga, K. 1986. Nuclear Magnetic Resonance studies on poly(β-hydroxybutyrate) and a copolyester of β-hydroxybutyrate and β-hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16. Macromolecules. 19:2860-2864.

Doi, Y., Segawa, A., Nakamura, S., and Kunioka, M. 1992. In: Dawes E. H. (ed.). Novel Biodegradable Microbial Polymer, 2nd ed. Kluwer Academic Publishers, Dordercht, pp.37-48.

Doi, Y., Kunioka, M. Nakamura, Y., and Soga, K. 1987a. Biosynthesis of copolyesters in *Alcaligenes eutrophus* H16 from ^{13}C-labeled acetate and propionate. Macromolecules. 20:2988-2991.

Doi, Y., Tamaki, A., Kunioka, M., and Soga, K. 1987b. Biosynthesis of an unusual copolyesters (10 mol% 3-hydroxybutyrate and 90 mol% 3-hydroxyvalerate units) in *Alcaligenes eutrophus* from pentanoic acid. Chem. Soc., Chem. Commun. 1653-1654.

Grothe, E., Moo-Young, M., and Chisti, Y. 1999. Fermentation optimization for the production of poly(β-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. Enzyme and Microbial Technology. 25:132-141.

Hammond, T. and Liggat, J. J. 1995. Properties and applications of bacterially derived polyhydroxyalkanoates. Scott, G. and Gilead, D. (eds.), Dedradable Polymers, pp. 88-111. London : Chapman&Hall.

Hassan, M. A., Shirai, Y., Kusubayashi, N., Karim, M. I. A., Nakanishi, K., and Hashimoto, K. 1996. Effect of organic acid profiles during anaerobic treatment of palm oil mill effluent on the production of polyhydroxyalkanoates by *Rhodobacter sphaeroides*. Annual Reports of IC Biotech. 19:650-655.

Holmes, P. A. 1985. Applications of PHB - a microbially produced biodegradable thermoplastic. Phys. Technol. 16: 32-36.

Hu, W. F., Chua, H., and Yu, H. F. 1997. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) from activated sludge. Biotechnol. Lett. 19:695-698.

Johansson, A. 1992. Clean technology. Boca Roton: Lewis Publishers. pp.167-181.

Kemper, A. J. 1974. Determination of sub-microquantitative of ammonia and nitrate in soil with phenol, sodium nitroprusside and hypochorite. Geoderma. 12:201-206.

Kim, G. J., Yim, K. Y., Bae, K. S., and Rhee, Y. H. 1992. Accumulation of copolyester consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes* sp. SH-69 in batch culture Appl. Microbiol. Biotechnol. 37:1-6.

Kim, J. H., Kim, B. G., and Choi, C. Y. 1992. Effect of propionic acid on Poly(β-hydroxybutyric-*co*-β-hydroxyvaleric) acid production by *Alcaligenes eutrophus*. Biotechnol. Lett. 14:903-906.

Kim, M. K., Lee, I. Y., and Park, Y. H. 1996. Metabolites and amino acids affecting cellular cofactor concentrations and poly-β-hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus*. Biotechnol. Lett. 18:559-564.

Kim, T. W., Park, J. S., and Lee, Y. H. 1996. Enzymatic characteristics of biosynthesis and degradation of poly-β-hydroxybutyrate of *Alcaligenes latus*. J. Microbiol. Biotech. 6:425-431.

Kimura, Y. 1993. Biocompatible polymers: Biodegradable polymers. Tsuruta, T. et al. (eds.) Biomedical application of polymeric material, pp.163-189. CRC Press, Inc.

Kunioka, M., Tamaki, A., and Doi, Y. 1989. Crystalline and thermal properties of bacterial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-*co*-4-hydroxybutyrate). Macromolecules. 22:694-697.

Lee, E. Y., Kang, S. H., and Choi, C. Y. 1995. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) by newly isolated *Agrobacterium* sp. SH-1 and GW-014 from structurally unrelated single carbon substrates. J. Ferment. Bioeng. 79:328-334.

Lee, I. Y., Kim, M. K., Chang, H. N., and Park, Y. H. 1994. Effects of propionate on accumulation of poly(β-hydroxybutyrate-*co*-β-hydroxyvalerate) and excretion of pyruvate in *Alcaligenes eutrophus*. Biotechnol. Lett. 16:611-616.

Lee, I. Y., Stegantseva, E. M., Savenkova, L., and Park, Y. H. 1995. Effect of nitrogen and oxygen supply on production of poly-β-hydroxybutyrate in *Azotobacter chroococcum*. J. Microbiol. Biotech. 5:100-104.

Lee, K. T., Kim, J. Y., Rhee, Y. H. Bae, K. S., and Kim, Y. B. 1995. Biosynthesis Poly-β-hydroxyalkanoates by *Bacillus thuringiensis* R-510. J. Microbiol.. 23:59-65 .

Lee, S. Y. 1996a. Plastic bacteria Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. Tibtech. 14:431-437 .

Lee, S. Y. 1996b. Review bacterial polyhydroxyalkanoates. Biotechnol. Bioeng. 49:1-14 .

Lee, S. Y. 1999. Polyhydroxyalkanoate by recombinant *Escherichia coli*. Abstracts of APBioChEC'99. pp. 33. Phuket. Thailand.

Lee, S. Y., Lee, Y. K., and Chang, H. N. 1995. Stimulatory effects of amino acids and Oleic acid on poly(3-hydroxybutyric acid) synthesis by recombinant *Escherichia coli*. J. Ferment. Bioeng. 79:177-180.

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

Lefebvre, G., Rocher, M., and Braunegg, G. 1997. Effects of low dissolved-oxygen concentrations on poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) production by *Alcaligenes eutrophus*. Appl. Environ Microbiol. 63:827-833.

Li, S., and Vert, M. 1995. Biodegradation of aliphatic polyesters. Scott, G. and Gilead, D. (eds.), Dedradable polymers, pp.43-47. London : Chapman&Hall.

Luzier, W. D. 1992. Materials derived from biomass/biodegradable materials. Proc. Nalt. Acad. Sci. USA. 89:839-842.

Macrae, R. M., and Wilkinson, J. F. 1958. Poly-β- hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. J. Gen. Microbiol. 19:210-222.

Madison, L. L., and Huisman, G. W. 1999. Metabolic Engineering of Poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63:21-53.

Narayan, R. 1994. Impact of governmental policies, Regulations and standards activities on an emerging biodegradable plastics industry. Doi, Y. and Fukuda, K. (eds.), Biodegradable Plastics and Polymers. pp. 261-272. Elsevier Science B.V.

Nobes, G. A. R., Holden, D. A., and Marchessault, R. H. 1994. Spreading of poly(β-hydroxyalkanates) at the air-water interface a model system for the nascent hydrotropic state to bacterial polyester. Polymer. 35:435-437.

O'Leary, W. M., ed. 1989. Practical Handbook of Microbiology. Boca Roton: CRC Press. pp.109-124.

Osterhout, G. J., Valentine, J. L., and Dick, J. D. 1998. Phenotypic and Genotypic characterization of clinical strains of CDC group IVc-2. Journal of Clinical Microbiology. 36: 2618-2622. PubMed Citation. (abstracts)

Page, W. J., Bhanthumnavin, N., Manchak., and Ruman, M. 1997. Production of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) copolymer from sugars by Azotobacter salinestris. Appl Microbiol Biotechnol. 48:88-93.

Page, W. J., Manchak, J., and Rudy, B. 1992. Formation of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD. Appl. Environ. Microbiol. 58:2866-2873.

Park, C. H., and Damodaran,V. K. 1994a. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) from ethanol and pentanol by *Alcaligenes eutrophus*. Biotechnol. Prog. 10:615-620.

Park, C. H., and Damodaran, V. K. 1994b. Effect of alcohol feeding mode on the biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate). Biotechnol. Bioeng. 44:1306-1314.

Park, S. K., Lee, K. T., Kim, Y. B., and Rhee, Y. H. 1997. Biosynthesis of polyhydroxybutyrate and poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) by *Bacillus thruringiensis* R-510. J. Microbiol. 35(2):127-133.

Pelczar, M. J., Chan, E. C. S., and Kreig, N. R. 1986. Microbiology. McGraw-Hill Book Company. Singapore.

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

Ramsay, B. A., Lomaliza, K., Chavarie, C., Dube, B., Bataille, P., and Ramsay, J. A. 1990. Production of poly(β-hydroxybutyric-*co*-hydroxyvaleric). Appl. Environ. Microbiol. 56:2093-2098.

Rhee, Y. H., Jang, J. H., and Rogers, P. L. 1993. Production of copolymer consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by fed-batch culture of *Alcaligenes* sp. SH-69. Biotechnol. Lett. 15:377-382.

Savenkova, L., Gercberga, Z., Kizhola, Z., and Stegantseva, E. 1999. Effect of phosphate supply and aeration on poly-β-hydroxybutyrate production in *Azotobacter chroococcum*. Process Biochemistry. 34:109-114.

Shimizu, H., Abe, N., Chanprateep, S., Yamane, T., and Shioya, S. 1999a. Multi-inputs Multi-outputs control of alcohol concentrations in biodegradable polymer, PHAs, production process by *Paracoccus denitrificans*. Abstracts of APBioChEC'99. pp. 34. Phuket. Thailand.

Shimizu, H., Kozaki Y., Kodama, H., and Shioya, S. 1999b. Maximum production strategy for biodegradable copolymer P(HB-*co*-HV) in fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus*. Biotechnol. Bioeng. 62: 518-525.

Slepecky, R. A., and Law, J. H. 1960. A rapid spectrophotometric assay of alpha, beta-unsaturated acids and beta-hydroxy acids. Analytical Chemistry. 32:1697-1699.

Son, H., and Lee, S. 1996. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) from structurally unrelated single carbon sources by newly isolated *Pseudomonas* sp. EL-2. Biotechnol. Lett. 18:1217-1222.

Son, H., Park, G., and Lee, S. 1996. Growth-associated production of poly-β-hydroxybutyrate from glucose or alcoholic distillery wastewater by *Actinobacillus* sp. EL-9. Biotechnol. Lett. 18:1229-1234.

Suzuki, T., Miyake, M., Tokiwa, Y., Saegusa, H., Saito, T., and Asada, Y. 1996. A recombinant cyanobacterium that accumulations poly-(hydroxybutyrate). Biotechnol. Lett. 18: 1047-1050.

Steinbuchel, A., and Fuchtenbusch, B. 1998. Bacterial and other biological systems for polyester production. Tibtech. 16: 419-426.

Steinbuchel, A., and Pieper, U. 1992. Production of a copolyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon source by a mutant of *Alcaligenes eutrophus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37:1-6.

Valentin, H. E., and Dennis, D. 1996. Metabolic pathway for poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) formation in *Nocardia corallina*: Inactivation of *mutB* by Chromosomal integration of a kanamycin resistance gene. Appl. Environ. Microbiol. 62:372-379.

Voet, D., and Voet, J. G. 1995. Biochemistry. 2nd. USA: John Wiley & Son Inc.

Wang, F., and Lee, S. Y. 1997. Poly(3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. Appl. Environ. Microbiol. 63:3703-3706.

Williamson, D. H., and Wilkinson, J. F. 1958. The isolation and estimation of the poly-β-hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species. J. Gen. Microbial. 19:198-209.

Wool, R. P. 1994. Perspectives on standard test methods for biodegradable plastics. Doi, Y., and Fukuda, K. (eds.), Biodegradable Plastics and Polymers. pp. 250-258. Elsevier Science B.V.

Yamane, T., Fukunaga, M., and Lee, Y. W. 1996. Increased PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associated PHB producer. Biotechnol. Bioeng. 50:197-202.

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

Yoon, J. S., Kim, J. Y., and Rhee, Y. H. 1995. Effect of amino acid addition on molar fraction of 3-hydroxyvalerate in copolyester of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate synthesized by *Alcaligenes* sp. SH-69. J. Ferment. Bioeng. 80:350-354.

Zhang, H., Obias, V., Gonyer, K., and Dennis, D. 1994. Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichi coli* and *Klebsiella* strains. Appl. Environ. Microbiol. 60:1198-1205.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมกราฟมาตรฐาน และสารที่ใช้ในงานวิจัย

1. การเตรียมกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

เตรียมหัวเชื้อของ *Bacillus* sp. BA-019 ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อให้อายุได้อายุ 24 ชั่วโมง ตวงปริมาตรต่างๆกัน ปั่นแยกเซลล์ที่ 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วนำเซลล์มากระจายในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำตัวอย่างแต่ละค่าการเจือจางมาหาค่าการดูดกลืนแสง น้ำหนักเซลล์แห้ง แล้วนำมาหาค่าความชันโดยสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักเซลล์แห้ง

2. การเตรียมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase)

2.1 สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ เตรียมจากการละลายโซเดียมอะซิเตตปริมาณ 9.10 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติก 1.90 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 4.5 ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

2.2 สารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส เตรียมจากการละลายเอนไซม์อินเวอร์เทสปริมาณ 0.15 กรัม ในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

3. การเตรียมสารละลายกรดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA reagent)

สารละลายกรดไนโตรซาลิไซลิก เตรียมจากละลายกรดไนโตรซาลิไซลิกปริมาณ 1.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมโพแตสเซียมโซเดียมตาร์เตรต 30 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ เก็บไว้ในขวดสีชา

4. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน

4.1 สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เตรียมจากการละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ปริมาณ 150 กรัมในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ

4.2 สารละลายฟีนอลไนโตรพัสซายด์ เตรียมจากการละลายฟีนอล 7 กรัม และโซเดียมไนโตรพัสซายด์ปริมาณ 34 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุ 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.3 สารละลายบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรต์ เตรียมจากละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.48 กรัมในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 70 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 4.98 กรัม และสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (คลอรอกซ์ 5-5.25 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปรับ pH อยู่ในช่วง 11.4 - 12.2 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ

4.4 สารละลาย EDTA เตรียมจากการละลาย EDTA ไดโซเดียมซอล์ทปริมาณ 6 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7 ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ

5. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณยูเรีย

5.1 สารละลายพาราไดเทธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (DMAB) เตรียมจากการละลายพาราไดเทธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ปริมาณ 16.00 กรัม ในเมทานอล 1 ลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริก 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ได้นาน 1 เดือน

5.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เตรียมจากการละลายโพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตแอนไฮดรัส 3.403 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุ 100 มิลลิลิตร และละลายไดโพแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตแอนไฮดรัส 4.355 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายทั้งสองรวมกันแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ

ภาคผนวก ข

สูตรคำนวณ

1. **การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง**

สูตร น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) = $\frac{\text{น้ำหนักถ้วยที่มีเซลล์ - น้ำหนักถ้วยเปล่า} \times 1000}{10}$

2. **การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟฟี**

การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ของ 2HB 3HB 4HB และ 3HV (กรัมต่อลิตรต่อ lyophilized cell 20 มิลลิกรัม) ทำการประมวลผลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Star chromatogram: version 4.02 ซึ่งจะทำการคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ (กรัมต่อลิตร) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในสภาวะเดียวกัน

การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์แต่ละชนิด (กรัมต่อลิตร)

สูตร ปริมาณโมโนเมอร์ = $\frac{\text{ค่าจากการวิเคราะห์ (ก/ล)} \times \text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (ก/ล)}}{20 \times 1.1}$

3. **การคำนวณสัดส่วน (โมลเปอร์เซ็นต์) ของแต่ละโมโนเมอร์ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟฟี**

3.1 คำนวณหาปริมาณของแต่ละโมโนเมอร์ (กรัมต่อลิตร)

3.2 คำนวณหาจำนวนโมลของแต่ละโมโนเมอร์ โดยการหารด้วยน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละโมโนเมอร์ (น้ำหนักโมเลกุลของ 2HB 3HB 4HB และ 3HV = 86 86 86 และ 100 ตามลำดับ)

3.3 คำนวณหาสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)

สูตร โมลเปอร์เซ็นต์ของแต่ละโมโนเมอร์ = $\frac{\text{จำนวนโมลของโมโนเมอร์} \times 100}{\text{ผลรวมของจำนวนโมลของโมโนเมอร์ทั้งหมด}}$

4. **การคำนวณปริมาณซูโครส**

สูตร ปริมาณซูโครส (กรัมต่อลิตร) = $\frac{1}{\text{ความชัน}} \times A_{540} \times \text{ค่าการเจือจาง} \times \frac{1}{1000}$

5. **การหาปริมาณยูเรียในน้ำหมัก**

สูตร ปริมาณยูเรีย (กรัมต่อลิตร) = OD_{420} x ความชัน x ค่าการเจือจาง

6. **การหาปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจนในน้ำหมัก** (กรัมต่อลิตร)

สูตร ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต = OD_{636} x ความชัน x ค่าการเจือจาง x $\frac{132}{28}$ x $\frac{1}{1000}$

สูตร ปริมาณแอมโมเนียมคลอไรด์ = OD_{636} x ความชัน x ค่าการเจือจาง x $\frac{53.5}{14}$ x $\frac{1}{1000}$

หมายเหตุ 132 คือ น้ำหนักโมเลกุลของแอมโมเนียมซัลเฟต

28 คือ น้ำหนักโมเลกุลของธาตุไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟต

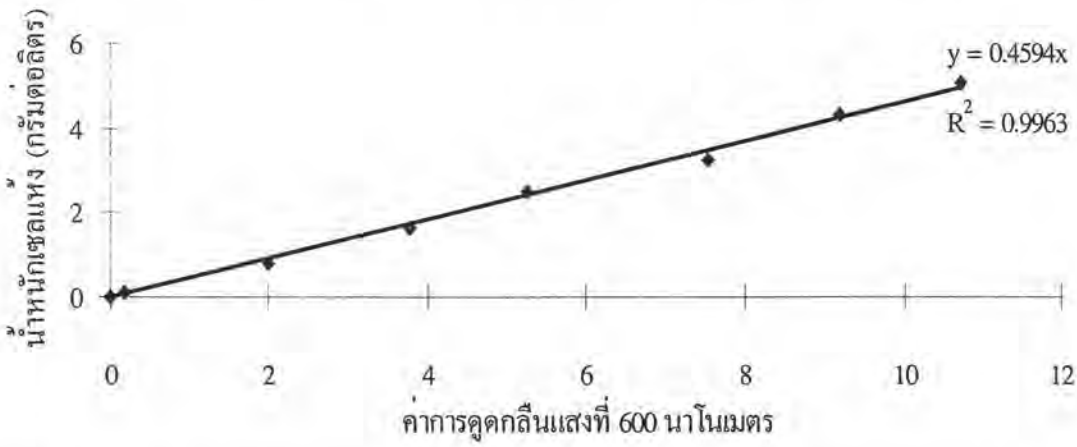
53.5 คือ น้ำหนักโมเลกุลของแอมโมเนียมคลอไรด์

14 คือ น้ำหนักโมเลกุลของธาตุไนโตรเจนในแอมโมเนียมคลอไรด์

ภาคผนวก ค

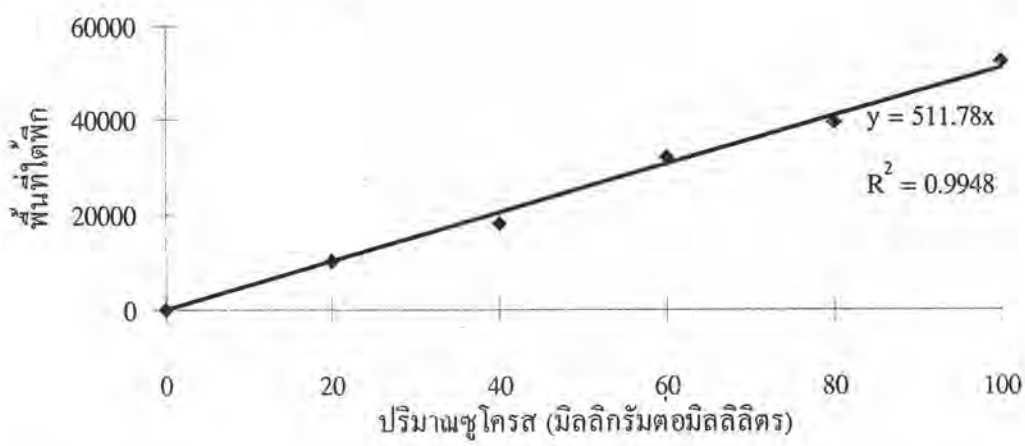
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร กับน้ำหนักเซลล์แห้ง



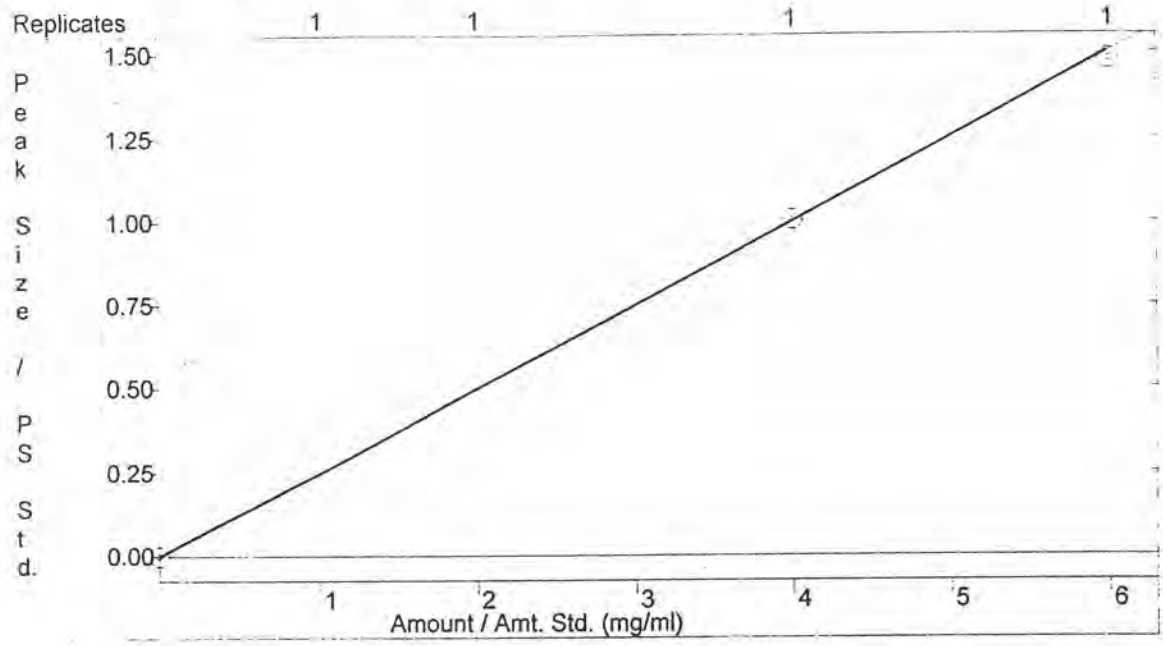
รูปที่ 34 กราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ความชัน เท่ากับ 0.46

2. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครส ด้วยวิธี HPLC



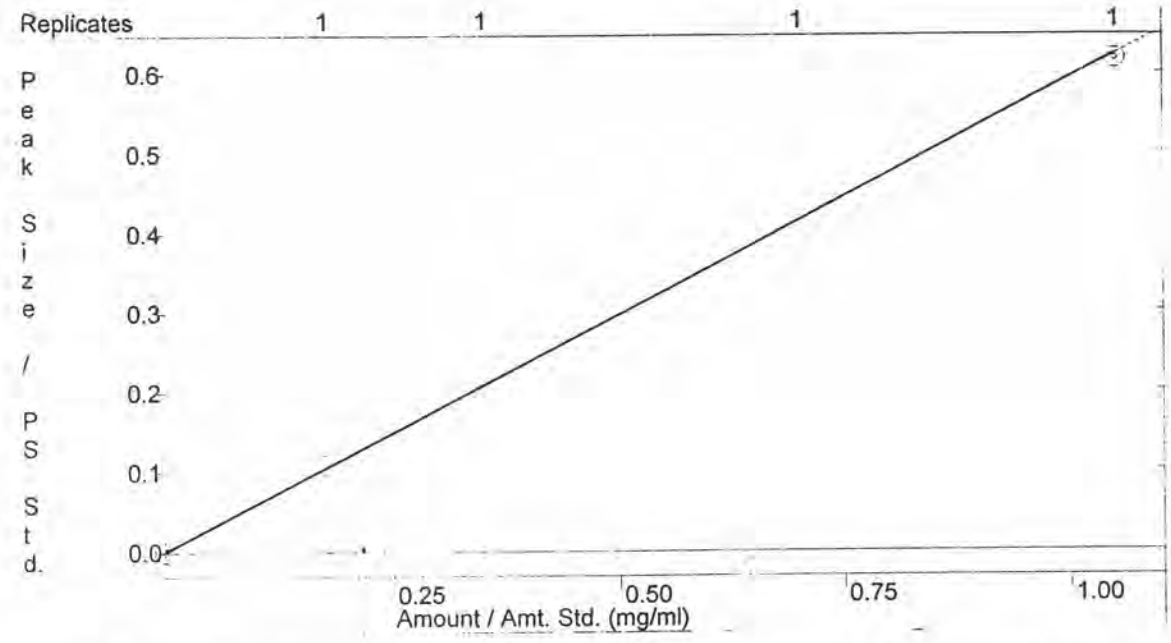
รูปที่ 35 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณซูโครส ด้วยวิธี HPLC ในช่วงความเข้มข้น 0 - 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความชัน เท่ากับ 5.1×10^2

3. กราฟมาตรฐานโมโนเมอร์ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3HB)



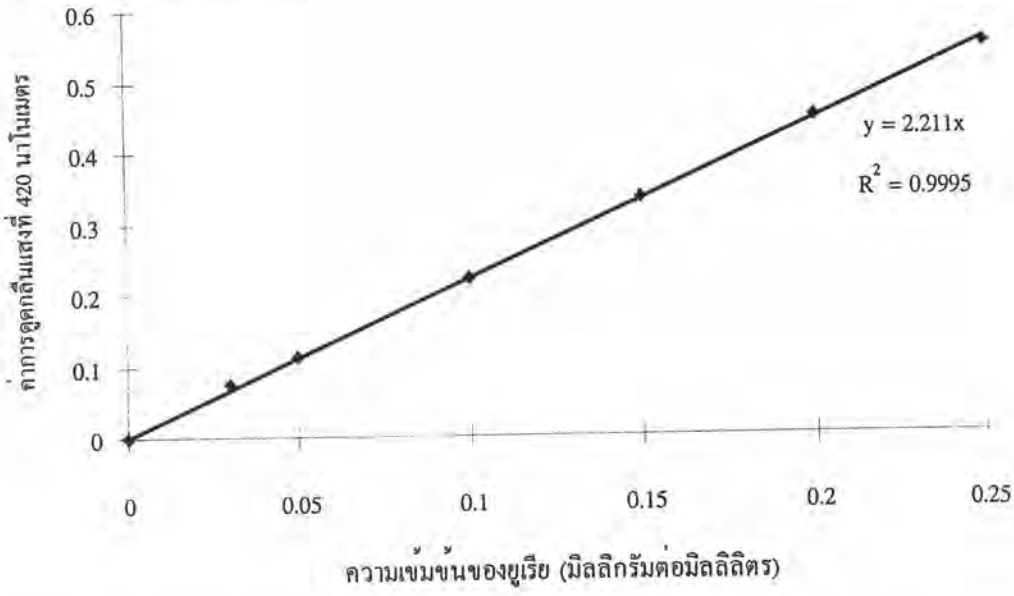
รูปที่ 36 กราฟมาตรฐานโมโนเมอร์ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ความเข้มข้น 0 - 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความชัน เท่ากับ 0.25

4. กราฟมาตรฐานโมโนเมอร์ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (3HV)



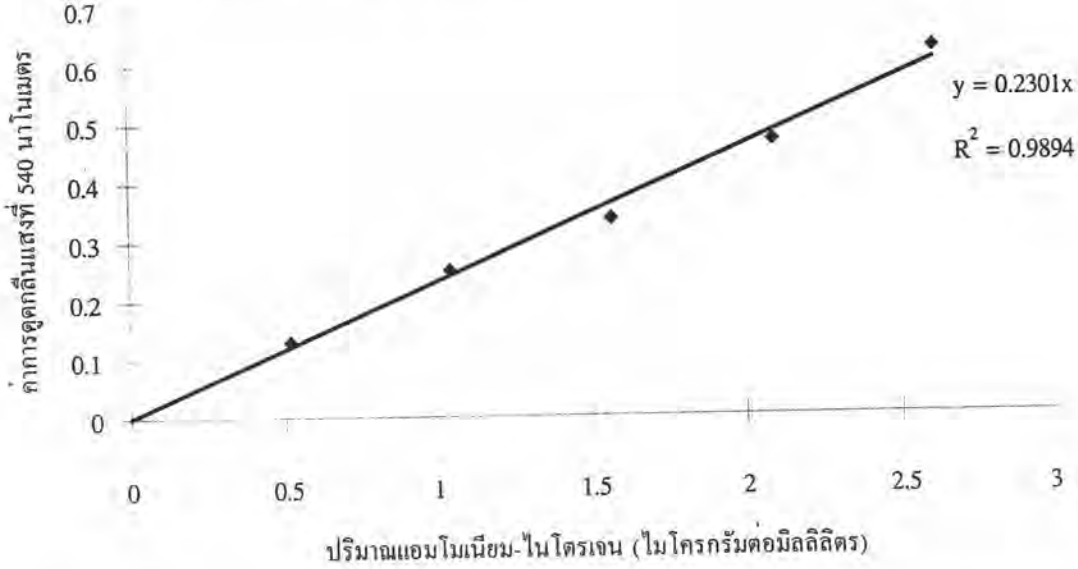
รูปที่ 37 กราฟมาตรฐานโมโนเมอร์ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต ความเข้มข้น 0 - 1.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความชัน เท่ากับ 0.59

5. กราฟมาตรฐานของยูเรีย



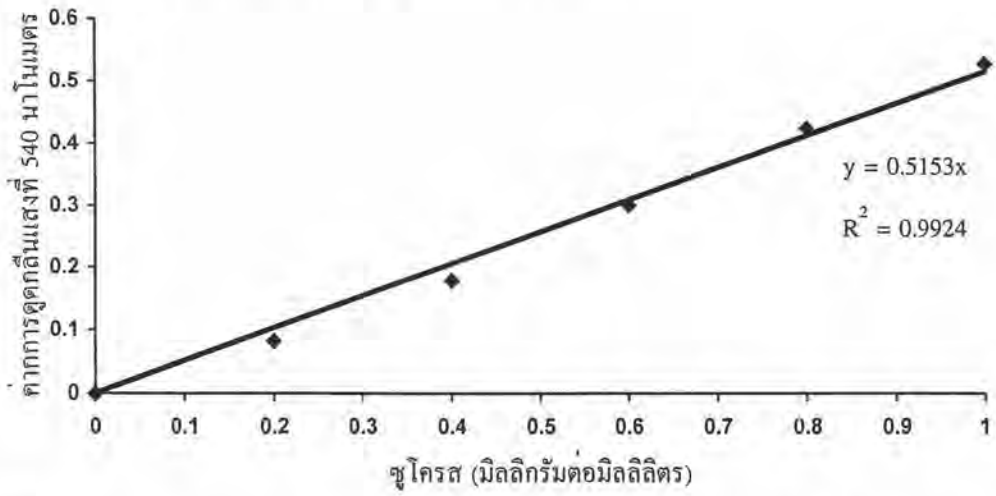
รูปที่ 38 กราฟมาตรฐานของยูเรียในช่วงความเข้มข้น 0 - 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความชัน เท่ากับ 2.2

6. กราฟมาตรฐานของแอมโมเนียม-ไนโตรเจน



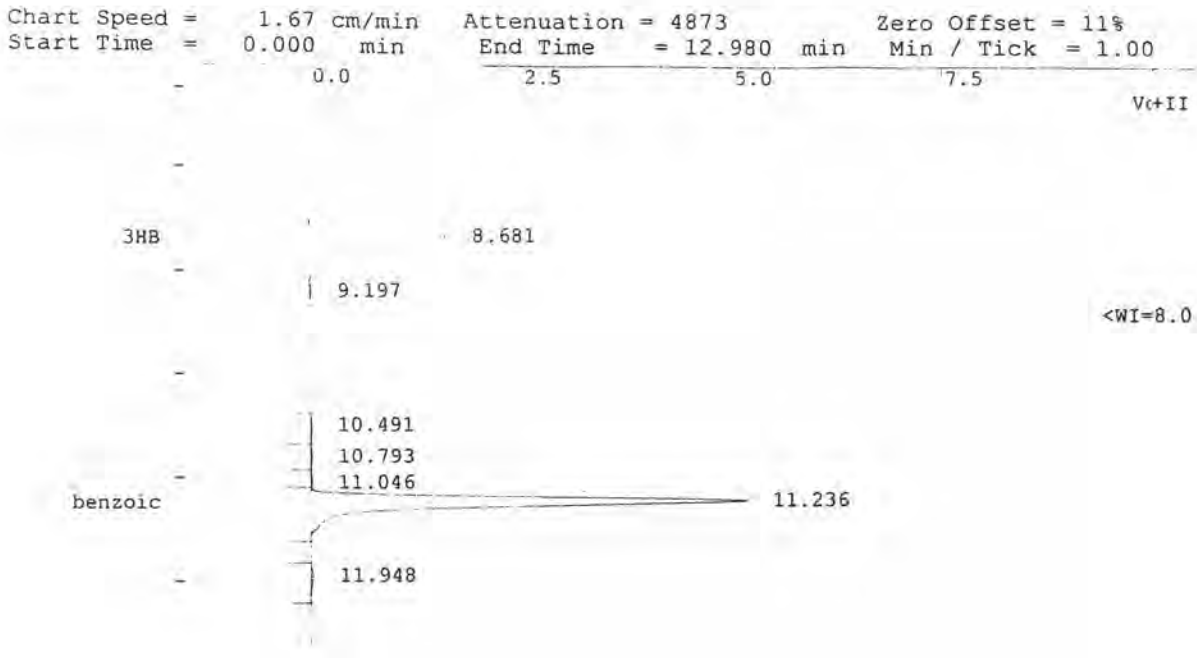
รูปที่ 39 กราฟมาตรฐานของแอมโมเนียม-ไนโตรเจน ในช่วงความเข้มข้น 0 - 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความชัน เท่ากับ 0.23

7. **กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครส (หาด้วยวิธี DNSA)**

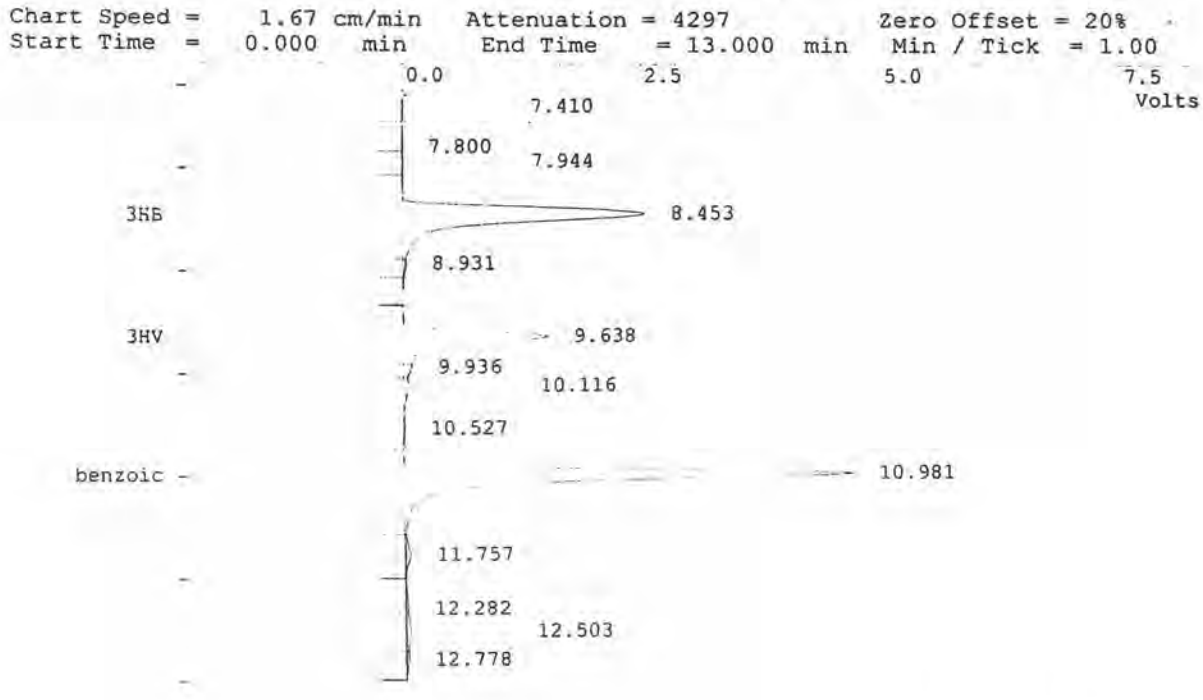


รูปที่ 40 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณซูโครส หาด้วยวิธี DNSA ในช่วงความเข้มข้น 0 - 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความชัน เท่ากับ 0.52

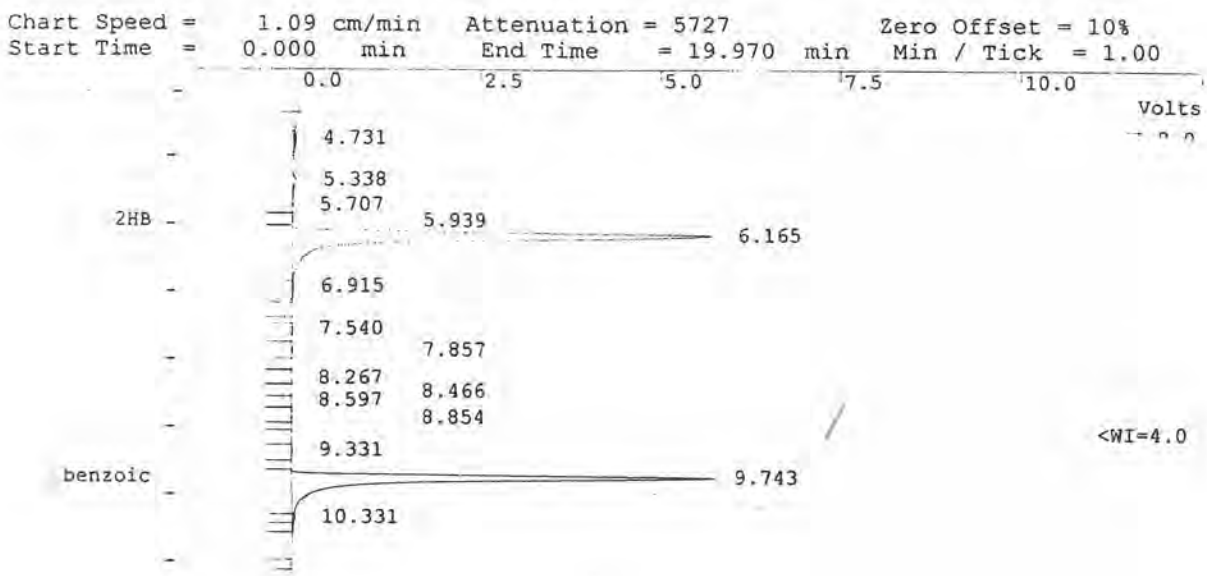
ตัวอย่างโครมาโตแกรม



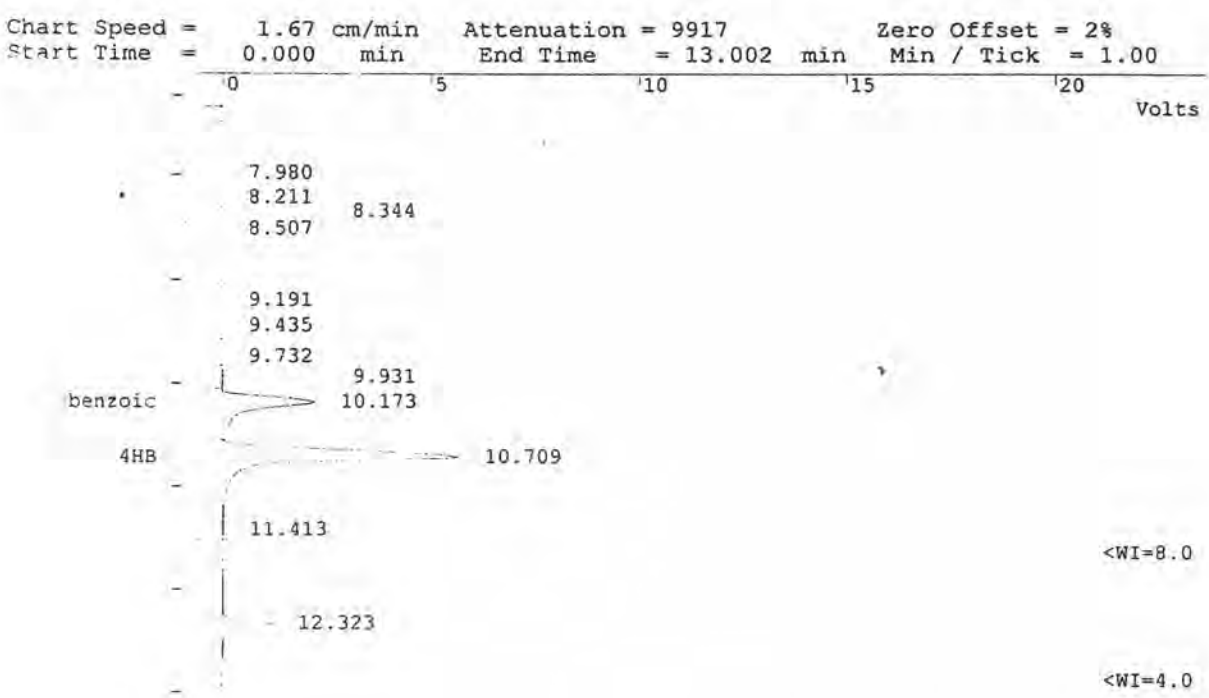
รูปที่ 41 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3HB) ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC



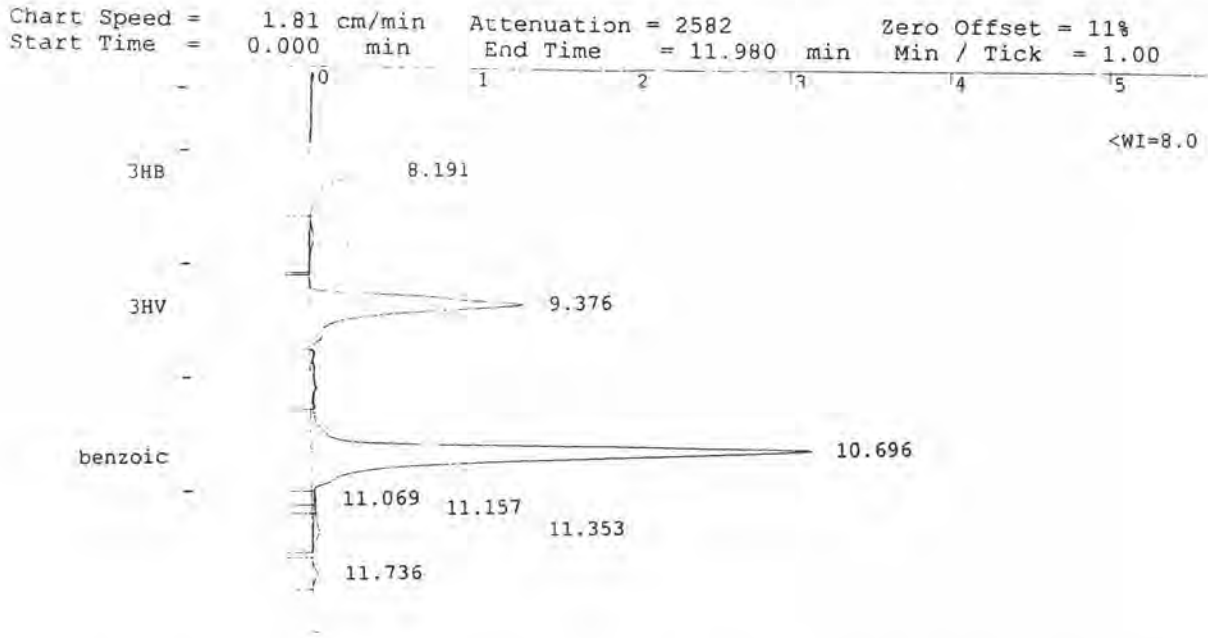
รูปที่ 42 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 3-ไฮดรอกวาเลอเรต (3HV) ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC



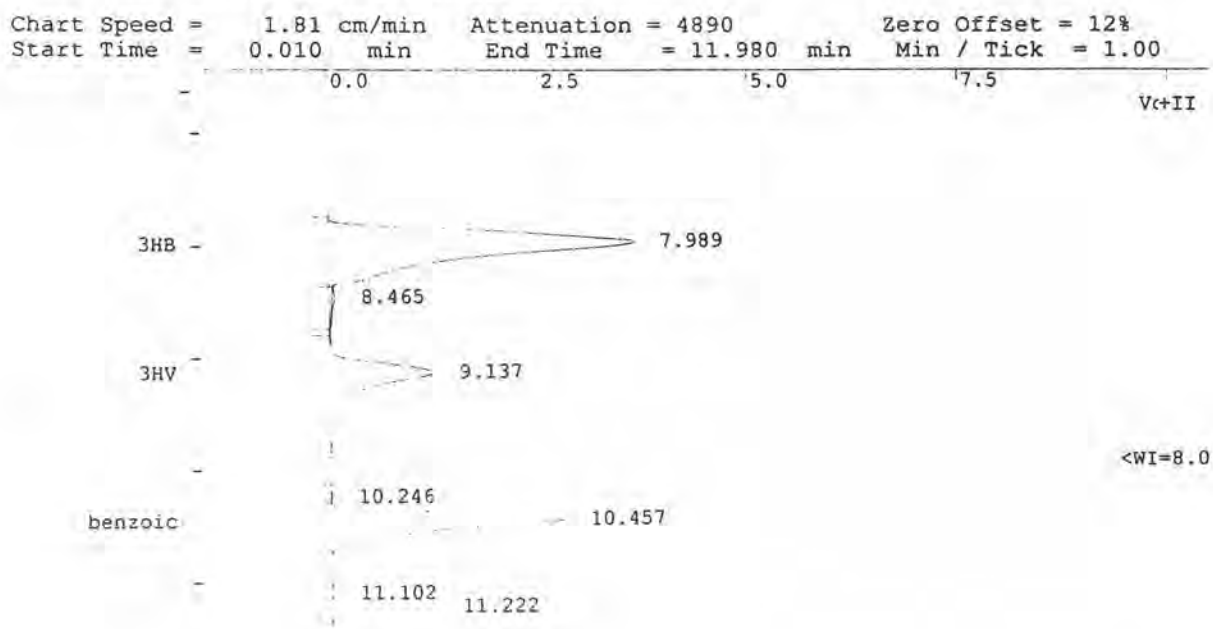
รูปที่ 43 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 2-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (2HB) ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC



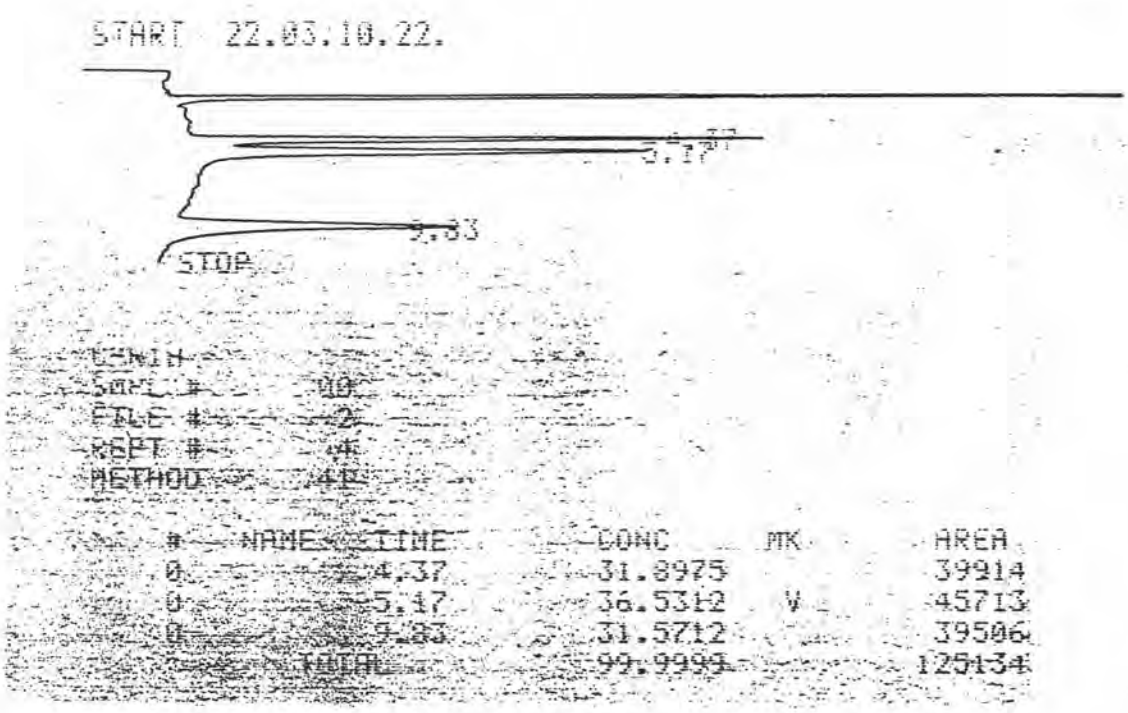
รูปที่ 44 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (4HB) ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC



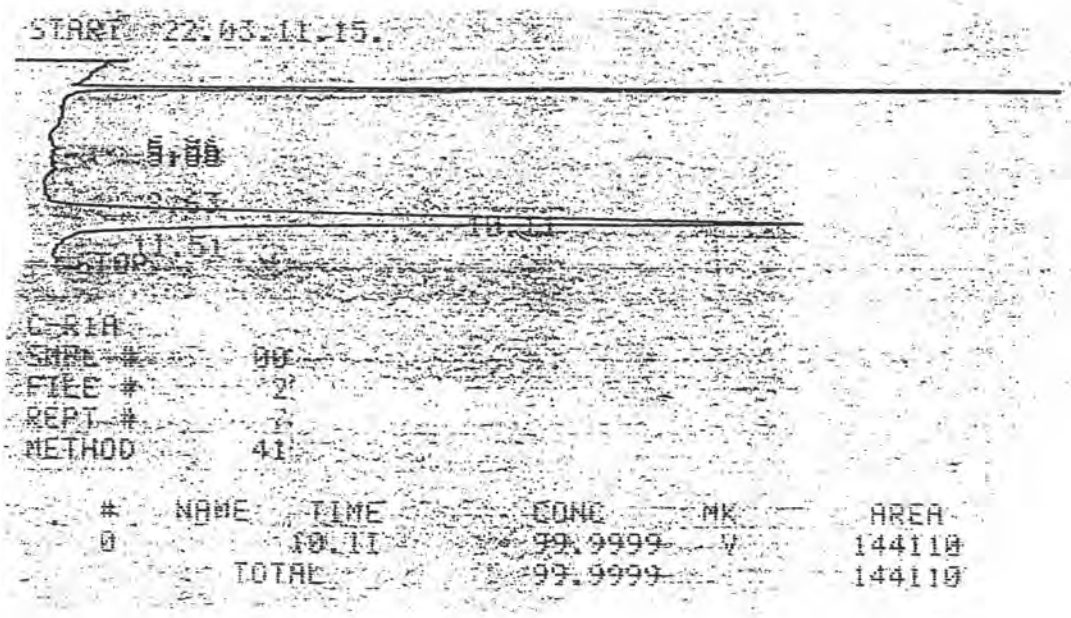
รูปที่ 45 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของโคพอลิเมอร์ PHBV ซึ่งผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยโซเดียมวาเลอเรต 20 กรัมต่อลิตร (ที่เวลา 60 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ วิเคราะห์ด้วยวิธี GC



รูปที่ 46 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของโคพอลิเมอร์ PHBV ซึ่งผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมอะซิเตต 1 กรัมต่อลิตรเป็นซับพลีเมนต์ ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC



(ก)



(ข)

รูปที่ 47 โครมาโตแกรมของน้ำตาลฟรักโตส กลูโคส และซูโครส มาตรฐาน (ก) โครมาโตแกรมของน้ำตาลทราย (ข) ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุดา สุภาชวินสวัสดิ์ เกิดวันที่ 4 ตุลาคม 2514 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เมื่อปีการศึกษา 2537 จากนั้นเข้าทำงานในแผนกควบคุมคุณภาพ บริษัทอินเตอร์เนชั่นแนลแลบบอราทอรีส์ จำกัด และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี การศึกษา 2539 ในระหว่างทำงานวิจัยได้นำเสนอผลงานวิจัยบางส่วนของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ในการประชุม The 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999 and The 11th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology ณ โรงแรมภูเก็ตอาร์คาเดีย จังหวัดภูเก็ต ในวันที่ 15 ถึง 18 พฤศจิกายน 2542