รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

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

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

สุชาดา จันทร์ประทีป. 2539. การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) โดย *Alcaligenes* sp. A-04 วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุดา สุภาชวินสวัสดิ์. 2542. ผลของซับเสตรทต่อสัดส่วนของ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ซึ่งผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เสาวรจน์ ช่วยจุลจิตร์. 2537. พอลิเมอร์ ซายน์ เล่ม 1. ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรมหาวิทยาลัย

อติพล บุญเรืองถาวร. 2543. การผลิต พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) โดยการเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 แบบป้อนเป็นงวดสองขั้นตอน ภายใต้การกำจัดปริมาณไนโตรเจน วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

Abate, R., Ballistreri, A., and Montaudo, G. 1994. Thermal Degradation of Microbial Poly (4- hydroxybutyrate). Macromolecules. 27: 332-336.

Amass, W., Amass, A., and Tighe, B. 1998. A Review of Biodegradable Polymers: Uses, Current Developments in the Synthesis and Characterization of Biodegradable Polyesters, Blends of Biodegradable Polymers and Recent Advances in Biodegradation Studies. Polymer International. 47: 89-144.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Anderson, A., and Dawes, E. 1990. Occurrence, Metabolism, Metabolic Role and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Microbiol. Rev. 54(4): 450-472.

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

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

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.

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

Bourgue, D., Ouellette, B., adra, Gand Grolean, D. 1992. Production of poly-β-hydroxybutyrate from methanol characterization of new isolate of *Methlyobacterium exterquens*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36 : 7 – 12.

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 Biodegradable Polyesters. Adv. Biochem. Eng. Biotechno. 41 : 77 – 93.

Brandl, H., Bachofen, R., and Wintermantel, E. 1995. Degradation and applications of hydroxyalkanoates. J. Microbiol. 41(Suppl. 1): 143-153.

Braunegg, G., Lefebvre, G., and Genser, K. 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. J. of Biotechnol. 65: 127-161.

Chiellini, E. 1994. Status of government policy, regulation and standards on the issue of biodegradable plastics materials in Italy. Doi, Y. ad Fukuda, K. (eds.),

Choi, M.H., Song, J.J., and Yoon, S.C. 1995. Biosynthesis of copolyesters by *Hydrogenophaga pseudoflava* from various lactones. Can. J. Microbiol. 41 (Suppl.1):60-67.

Choi, M.H., Yoon, S.C., and Lenz, R.W. 1999a. Production of Poly(3-Hydroxybutyric Acid-Co-4-Hydroxybutyric Acid) and Poly(4-Hydroxybutyric Acid) without Subsequent Degradation by *Hydrogenophaga pseudoflava*. Appl. and Environ. Microbiol. 65(4): 1570-1577.

Choi, J., Lee, S.Y. 1999b. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 13-21.

Comeau, Y., Hall, K.J., and Oldman, W.K. 1988. Determination of poly-β-hydroxybutyrate in activated sludge by gas chromatography. Appl. and 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.

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

Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y., and Soga, K. 1987a. Biosynthesis of copolyester in *Alcaligenes eutrophus* H-16 from ^{13}C-labelled acetate and propionate. Macromolecules. 20 : 2988 – 2991.

Doi, Y., Tamaki, A., Kunioka, M., and Soga, K. 1987b. Biosynthesis of terpolymers of 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyvalerate, and 5-hydroxyvalerate in *Alcaligenes eutrophus* from 5-chloropentanoic and pentanoic acids. Makromo Chem. Rapid. Commun. 8 : 631 – 635.

Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y., and Soga, K. 1988. Nuclear Magnetic Resonance Studies on Unusual Bacterial Copolyesters of 3-Hydrxybutyrate and 4-Hydroxybutyrate. Macromolecules. 21: 2722-2727.

Doi, Y., Segawa, A., and Kunioka, M. 1989. Biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced from γ-butyrolactone and butyric acid by *Alcaligenes eutrophus*. Polymer Commun. 30: 169-171.

Doi, Y., Kanesawa, Y., and Kunioka, M. 1990. Biodegradation of Microbial Copolyesters: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybuty-rate). Macromolecules. 23: 26-31.

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

Doi, Y., Segawa A., Nakamura, S., Kunioka, M. 1992. IN : Dawes Ea.(ed.) Novei biodegradable microbial polymers. , 2rd.edn. Kluwer Academic Publishers, Dordercht, pp. 37 – 48.

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

Egging, G., Smegen, J., Ongen-baysal, G. ad Huigberts, G.N.M. 1992. Bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). In Mathouth, M. (ed), Food pakaing and preservation pp. 182-194.

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

Gerald, D.B. Degradable Polymers [online].(n.d.). Available from; http://www.icma.com/ industry information.html[2002, June 21]

Gilbert, C.J. Bioplastic product. [online]. (n.d.). Available from. http://www.mosanto.com/bioplastic/bottum.html[1999, June 15].

Hassan, M.A., Shiral, Y., Kusubayashi, N., and Hashimoto, K. 1996. Effect of organic acid profile durig aaerobic treament of palm oil mill effuent on to production of polyhydroxyalkanoates by *Rhodobacter sphaeroides*. J. Ferment. Bioeng. 82 : 151 – 156.

Heinzle, E. and Lafferty, R.M. 1980. A kinetic model for growth and synthesis of poly(β-hydroxybutyric acid (PHB) from *Alcaligenes eutrophus*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 11:8-16.

Hiramitsu, M., Koyama, N. and Doi, Y. 1993. Production of Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes latus*. Biotechnol. Lett. 11:461-464.

Holmes, P.A. 1985. Application of PHA a microbial produced biodegradable thermoplastic. Physiol. Technol. 16 : 32-36.

Jendrossek, D., Schirmer, A.,Schlegel, H.G., 1996. Biodegradation of polyhydrxyalkanoic acids. Appl. Microbiol. Biotechol. 46 : 451 – 463.

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

Kang, C.K., Lee, H.S., and Kim, J.H. 1993. Accumulation of PHA and its copolyesters by *Methylobacterium* sp. KCTC 0048. Biotechnol. Lett. 15(10): 1071-1020.

Kang, C.K., Kusaka, S. and Doi, Y. 1995. Structure and properties of poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate) produced by *Alcaligenes latus* .Biotechnol. Lett. 17:583-588.

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

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.

Kimura, H., Yoshida, Y., and Doi, Y. 1992. Production of Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Pseudomonas acidovorans*. Biotechnol. Lett. 14(6): 445-450.

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

Kimura, H., Ohura, T., Takeishi, M., Nakamura, S., and Doi, Y. 1999. Effective microbial production of poly(4-hydrxybutyate) homopolymer by *Ralstonia eutropha* H16. Polymer International. 48: 1073-1079.

Kunioka, M., Nakamura, Y. and Doi, Y. 1988. New bacterial copolyesters produced in *Alcaligenes eutrophus* from organic acids. Polym. Commun. 29:174-176.

Kunioka, M., Kawaguchi, Y., and Doi, Y. 1989a. Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. Appl. Microbiol. and Biotechnol. 30: 569-573.

Kunioka, M., Tamaki, A., and Doi, Y. 1989b. 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, 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. and Bioeng. 49:1-14.

Lee, Y.H., Park, J.S. and Huh, T.L. 1997. Enhanced biosynthesis of P(3HB-co-3HV) and P(3HB-co-4HB) by amplification of the cloned PHB biosynthesis gene in *Alcaligenes eutrophus*. Biotechnol. Lett. 19:771-774.

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.

Madden, L.A., Anderson, A.J., Asrar, J., Berger, P., and Garrett, P. 2000. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) sythesized by *Ralstonia eutropha* in fed-batch cultures. Polymer.41:3499-3505.

Madison, L.L., and Huisman, G.W. 1999 . Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates) : From DNA to Plastic. Microbiol. and Mole. Biol. Rev . 63 (1): 21-53.

Mitomo, H., Hsieh, W.C. Nishiwake, K. Kasuya, K.and Doi, Y. 2001. Poly(3-hydroxyburate-co-4-hydroxybutrate) produced by *Comamonas acidovorans*. Polymer. 42:3455-3461.

Nakamura, K., Saito, T., Fukui, T., Shirakura, Y., and Tomita, K. 1985. Purification and properties of extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Pseudomonas lemoignei*. Biochemica et Biophysica Acta. 827: 63-72.

Nakamura, S., and Doi, Y. 1992. Microbial synthesis and characterization of Poly(3-hydroxybutyate-co-4-hydroxybutyrate). Macromolecules. 25(17): 4237-4241.

Nakamura, S.Y., Hiramitsu, M., Saito, Y., Doi, Y. 1996. Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). Polymer international. 39(3): 169-174.

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. Elesevier Science B.V.

Nojima, S., Mineki, S., and Iida, M. 1996. Purification and characterization of extracellular poly(3-Hydroxybutyrate) depolymerases produced by *Agrobacterium* sp. K-03. J. of Ferment. and Bioeng. 81(1): 72-75.

Oeding, V. and Schlegel, H.G. 1973. β-ketothiolase from H16 and its sinificance in the regulation of poly-β-hydroxybutyrate metabolism. Biochem. J. 134:239-248.

Oliver, P. Polymer properties.[online].(n.d.). Available from: http://www.maropolymeronline.com [1999, December 8]

Park, C.H. and Damodaran, V.K. 1994. Effect of alcohol feeding mode on the biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). Biotechnol. Bioeng. 44:1306-1324.

Paustian, T. Machanical [online]. (n.d.). Available from: http://www.machanical .com/plastics.html [2002,July 2].

Ramsay, B.A., Ramsay, J.A., and Cooper, D.G. 1989. Production of poly-β-hydroxyalkanoic acid by *Pseudomonas cepacia*. Appl. and Environ. Microbiol. 55:584-589.

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

Robards, E. Green plastic. [online]. (n.d.). Available from: http://www.friendlypackaging.org.uk/PHA granule html. [2002, July 10].

Saito, T., Suzuki K., Yamamoto, J.; Fukui, T., Miwa, K., Tomita, K., Nakanishi, S., Odani, S., Suzuki, J.I., and Ishikawa, K. 1989. Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression in *Escherichia coli* of the Gene for Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase from *Alcaligenes faecalis*. Jounal of Bacteriology. 171(1): 184-189.

Scandola, M., Pizzoli, M., Cecconelli, G., Cesara, A., paoletti, S. and Navarini, L. 1988. Viscoelasticity and thermal properties of bacterial poly(D-(-)-β-hydroxybutyrate). Int. of J. Bio. Macromol. 10:373-377.

Shi, F., and Gross, R.A. 1996. Microbial Polyester Synthesis: Effects of Poly(ethylene glycol) on Product Composition, Repeat Unit Sequence, and End Group Structure. Macromolecules. 29: 10-17.

Shi, F., Ashby D.R., and Gross, R.A. 1996. Fractionation and Characterization of Microbial Polyesters Containing 3-Hydroxybutyrate and 4-Hydroxybutyrate Repeat Units. Macromolecules. 30: 2521-2523.

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

Song, SS., Hein, S., Steinbuchel, A. 1999. Production of poly(4-hydroxybutyric acid) by fed-batch cultures of recombinant strains of *Escherichia coli*. Biotechnol. Lett. 21 (3): 193-197.

Spyros, A., and Marchessault, R.H. 1996. Segmental Dynamics in poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)s above the Glass Transition Temperature: ^{13}C Nuclear Magnetic Relaxation in the Amorphous Phase. Macromolecules. 29: 2479 - 2486.

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., Hustede, E., Liebergesell, M., Pieper, U., Timm, A., Valentin, H. 1992. Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 103 : 217 – 230.

Suzuki, T., Deduchi H Yamane T., Shiizu, S., and Gekko, K., Control molecular weight of poly-3-hydroxybutyric acid produced in fed-batch culture of *Protomonas extorquens*. Biotechnol. Lett. 18 : 1047 – 1050.

Taylor, L. Metabolix Biocycle [online]. (n.d.). Available from: http://www .metabolix.com/mbxbiocycle1.html [2001,August 3]

Valentin, H.E., Lee, E.Y. and Stienbbuche, 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., Zwingmann, G., Schonebaum, A., and Steinbuchel, A. 1995. Metabolic pathway for biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyate) from 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. Eur. J. Biochem. 227: 43-60.

Valentin, E., Dennis, D. 1997. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose. J. of Biotechnol. 58: 33-38.

Valentin, H.E., Reiser, Steven., and Gruys, K.J. 2000. Poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate) formation from gamma-aminobutyrate and glutamate. Biotechnol. and Bioeng. 67(3): 291-299.

Wallen, L.L., and Rohwedder, W.K. 1974. Polyhydroxyalkanoate from activated sludge. Environ. Sci. Technol. 8:576-579.

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

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

Yoshie, N., Menju, H., Sato, H. and Inoue, Y. 1995. Complex Composition Distribution of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). Macromolecules. 28:6516-6521.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมกราฟมาตรฐาน และสารที่ใช้ในงานวิจัย

1. **การเตรียมกราฟมาตรฐานการเจริญของ *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ**

เตรียมหัวเชื้อของ *Bacillus* sp. BA-019 ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ติดตามการเจริญทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตวงปริมาตร10 มิลลิลิตร ปั่นแยกเซลล์ที่ 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วนำเซลล์มากระจายในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ล้างเซลล์สองครั้ง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 12-18 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยสร้างกราฟมาตรฐาน การเจริญของ *Bacillus* sp. BA-019

2. **การเตรียมสารละลายอินเวอร์เทส** (invertase)

2.1 สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ เตรียมจากการละลายโซเดียมอะซิเตตปริมาณ 9.10 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติก 1.90 มิลลิลิตร ปรับ ความเป็นกรด-ด่าง 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 กรัมในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมโพแตสเซียมโซเดียมตาร์เตรต 30 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ เก็บไว้ในขวดสีชา

4. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน

4.1 สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เตรียมจากการละลายโปแตส-เซียมคลอไรด์ปริมาณ 150 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 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 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 70 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 4.98 กรัม และสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (คลอรอกซ์ 5-5.25 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 11.4 – 12.2 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ

4.4 สารละลาย EDTA เตรียมจากการละลาย EDTA ไดโซเดียมซอล์ทปริมาณ 6 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 7 ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สูตรคำนวณ

1. **การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง**

สูตร น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) = $\frac{\text{น้ำหนักถ้วยที่มีเซลล์ - น้ำหนักถ้วยเปล่า} \times 100}{10}$

2. **การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟฟี**

การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ของ 3HB 3HV และ 4HB (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) ขงแต่ละโมโนเมอร์ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟฟี**

3.1 คำนวณหาปริมาณของแต่ละโมโนเมอร์ (กรัมต่อลิตร)

3.2 คำนวณหาจำนวนโมลของแต่ละโมโนเมอร์ โดยการหารด้วยน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละโมโนเมอร์ (น้ำหนักโมเลกุลของ 3HB 4HB และ 3HV = 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. การหาปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจนในน้ำหมัก (กรัมต่อลิตร)

สูตร ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต = $OD_{420} \times \text{ความชัน} \times \text{ค่าการเจือจาง} \times \frac{132}{28} \times \frac{1}{1000}$

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

หมายเหตุ 132 คือ น้ำหนักโมเลกุลของแอมโมเนียมซัลเฟต

28 คือ น้ำหนักโมเลกุลของธาตุไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟต

53.5 คือ น้ำหนักโมเลกุลของแอมโมเนียมคลอไรด์

14 คือ น้ำหนักโมเลกุลของธาตุไนโตรเจนในแอมโมเนียมคลอไรด์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. การทดสอบความแตกต่างระหว่างมัชฌิมเลขคณิต โดยการทดสอบค่า t

ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของความแตกต่างระหว่างมัชฌิมเลขคณิต (σ_{x1-x2}) มีสูตรหาได้ดังนี้

1.1 จาก $\sigma_{x1-x2} = \sqrt{(\sigma_{x1}^2+\sigma_{x2}^2)}$

1.2 จาก $\sigma_{x1}^2 = S_1^2/n_1$ และ $\sigma_{x2}^2 = S_2^2/n_1$

1.3 $\therefore \sigma_{x1-x2} = \sqrt{(S_1^2/n_1 + S_2^2/n_1)}$

1.4 สูตรความแปรปรวนที่แก้ความลำเอียงแล้ว คือ

$$S^2 = \Sigma X^2/(n-1)$$

1.5 แทนค่าสูตรข้อ 1.3 ได้

$$\sigma_{x1-x2} = \sqrt{(\Sigma X_1^2/ n_1(n_1-1) + \Sigma X_2^2/ n_2(n_2-1))}$$

1.6 ความแปรปรวนร่วมคือ

$$[(\Sigma X_1^2) + (\Sigma X_2^2)]/(n_1+n_2-2)$$

1.7 แทนค่าสูตรข้อ 1.5 ได้

$$\sigma_{x1-x2} = \sqrt{([(\Sigma X_1^2) + (\Sigma X_2^2)]/[n_1(n_1+n_2-2)] + [(\Sigma X_1^2) + (\Sigma X_2^2)]/[n_2(n_1+n_2-2)]}$$

1.8 $\therefore \sigma_{x1-x2} = \sqrt{\{[(\Sigma X_1^2) + (\Sigma X_2^2)]/[n_1(n_1+n_2-2)][(1/n_1)+(1/n_2)]\}}$

1.9 ถ้า $n_1 = n_2$ สูตรเป็น

$$\sigma_{x1-x2} = \sqrt{\{(\Sigma X_1^2) + (\Sigma X_2^2)]/[n(n-1)]\}}$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การวิเคราะห์ความแปรปรวนและหาค่าสถิติ F

แบบของข้อมูลเป็นดังนี้

คะแนนของกลุ่ม (ตัวอย่าง)

A	B	C
$X_{A1}, X_{A2},\ldots, X_{An}$	$X_{B1}, X_{B2},\ldots, X_{Bn}$	$X_{B1}, X_{B2},\ldots, X_{Bn}$

ให้ $N = nA + nB + nC$

สมมติฐานทางสถิติเป็น $H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \ldots$

สรุปการวิเคราะห์ความแปรปรวน

แหล่ง (source)	df	ผลบวกของ $(X-X)^2$ SS	ความแปรปรวน MS = SS/df	F
ระหว่างกลุ่ม (among groups)	k-1	SSA	MSA = SSA/(k-1)	MSA/MSW
ภายในกลุ่ม (within group)	N-k	SSW = SST-SSA	MSW = SSW/(N-k)	
ทั้งหมด (total)	N-1	SST		

SSA = ผลบวกของกำลังสองของส่วนเบี่ยงเบนระหว่างกลุ่มจากมัชฌิมเลขคณิตร่วม

SSW = ผลบวกของกำลังสองของส่วนเบี่ยงเบนภายในกลุ่มจากมัชฌิมเลขคณิตร่วม

SST = ผลบวกของกำลังสองของส่วนเบี่ยงเบนของคะแนนจากมัชฌิมเลขคณิตร่วม

MSA = ความแปรปรวนระหว่างกลุ่ม

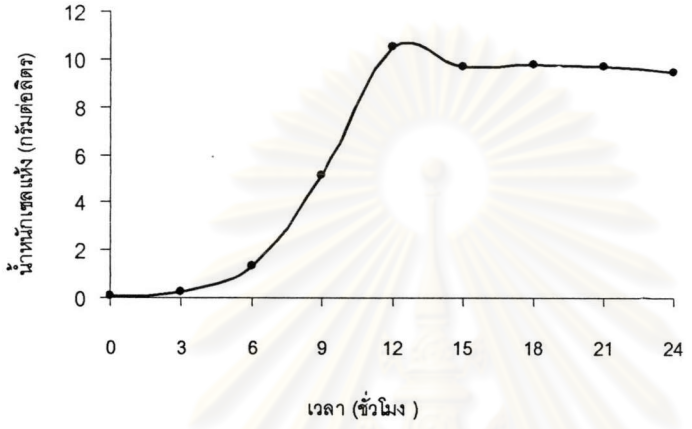
MSW = ความแปรปรวนภายในกลุ่ม

ค่า F มีชั้นแห่งความเป็นอิสระ (k-1), (N-k) ถ้าค่า F คำนวณได้มากกว่าค่า F จากตารางก็หมายความว่าทั้งสามกลุ่มต่างกันหรืออาจมีบางคู่ต่างกัน บางคู่ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ให้ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ละคู่โดยใช้ความคลาดเคลื่อนมาตราฐานที่คำนวณจาก MSW ซึ่งเป็นความแปรปรวนร่วม

ภาคผนวก ง

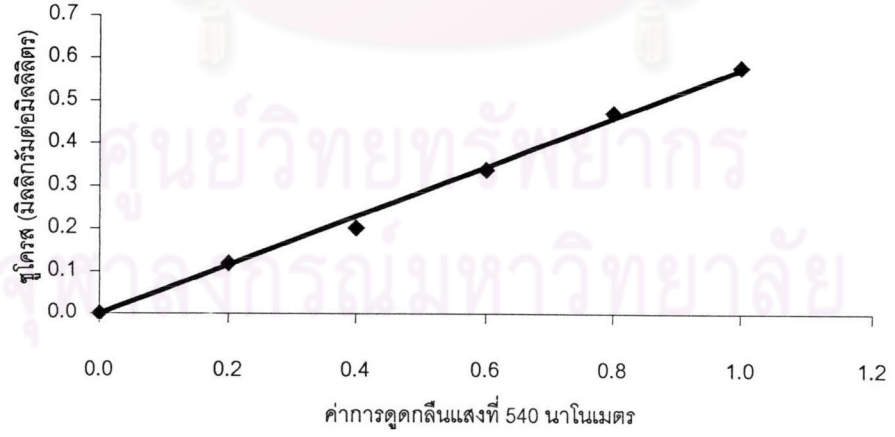
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐาน การเจริญของ *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ



กราฟมาตวฐานการเจริญของ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

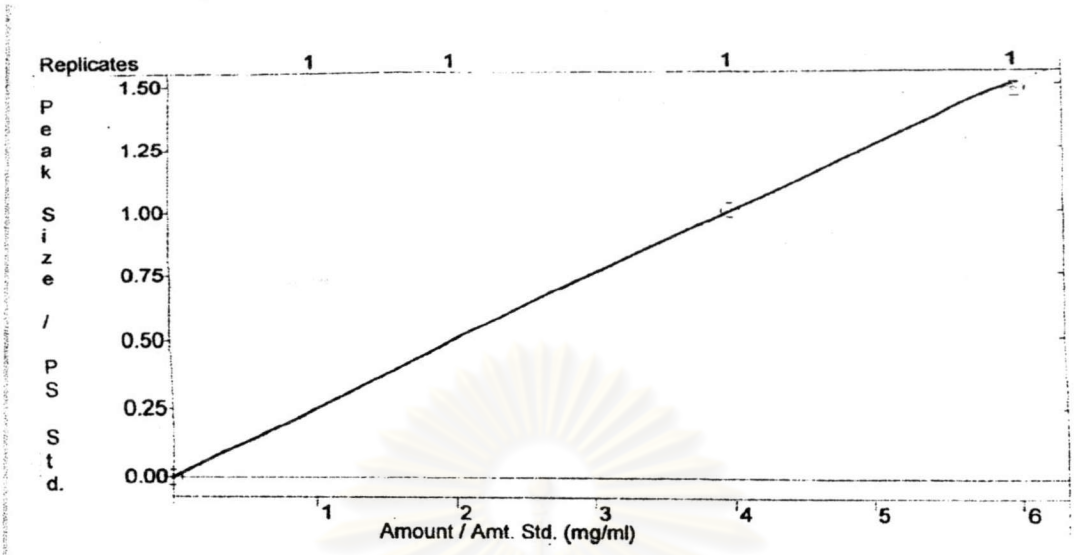
2. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครส (หาด้วยวิธี DNSA)



กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณซูโครส หาด้วยวิธี DNSA ในช่วงความเข้มข้น 0-1 มิลลิกรัมต่อลิตร ความชัน เท่ากับ 0.5837

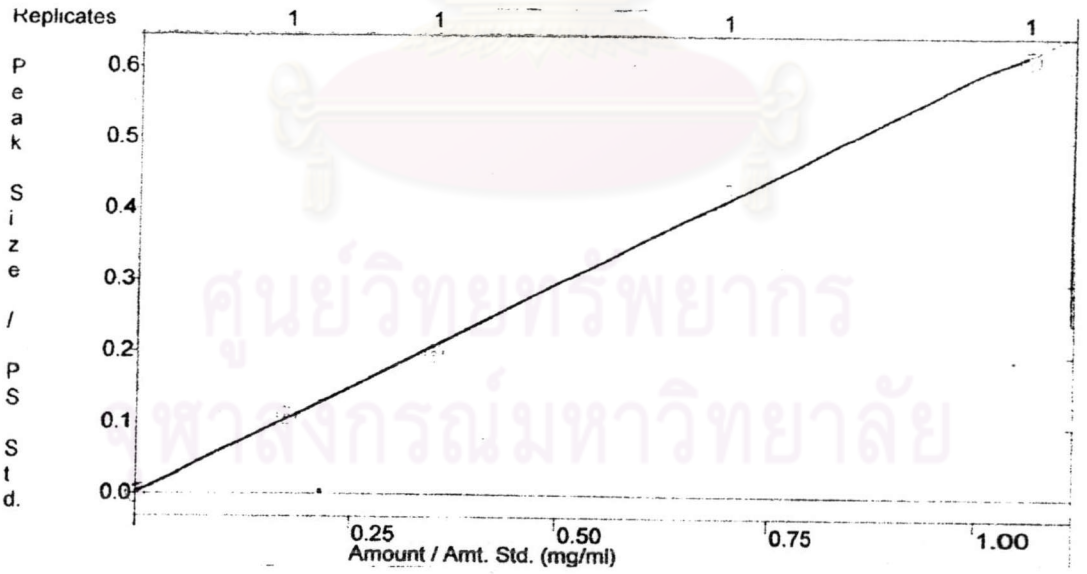
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. กราฟมาตรฐานโมโนเมอร์ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3HB)



กราฟมาตรฐานโมโนเมอร์ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ความเข้มข้น 0-6 มิลลิกรัมต่อลิตร ความชันเท่ากับ 0.25

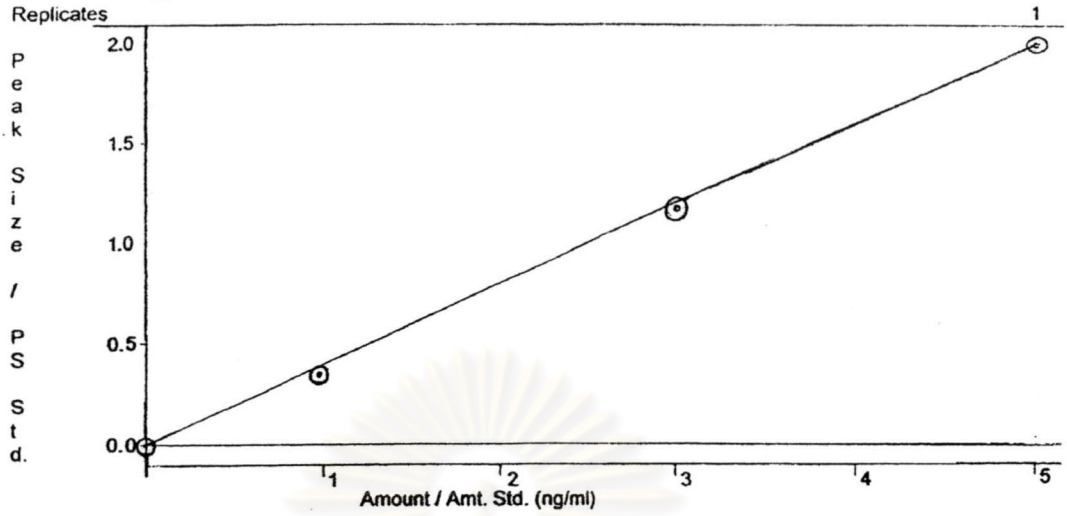
2. กราฟมาตรฐานโมโนเมอร์ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (3HV)



กราฟมาตรฐานโมโนเมอร์ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต ความเข้มข้น 0-1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความชัน เท่ากับ 0.59

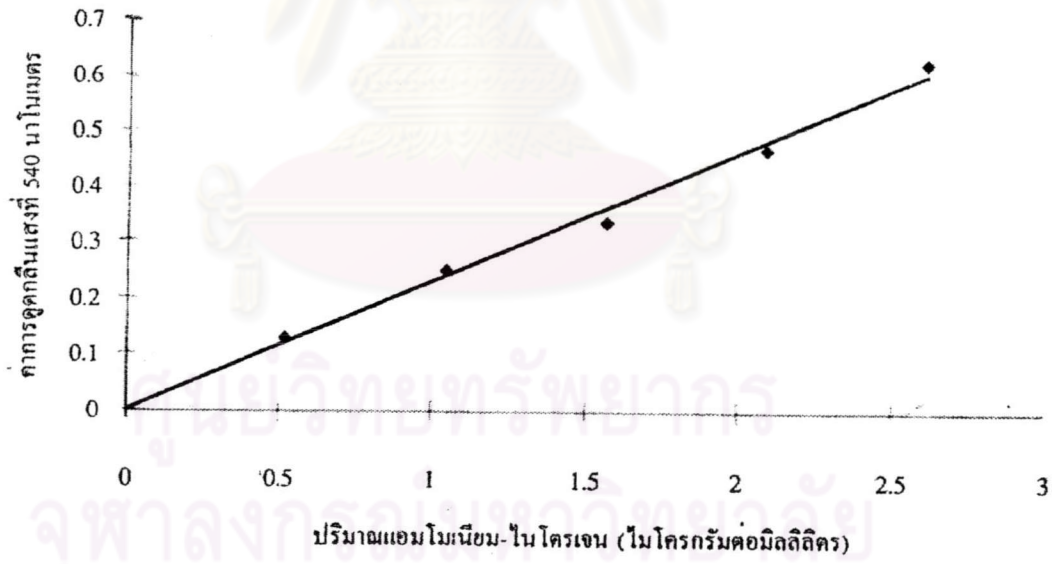
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. **กราฟมาตรฐานโมโนเมอร์ 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (4HB)**



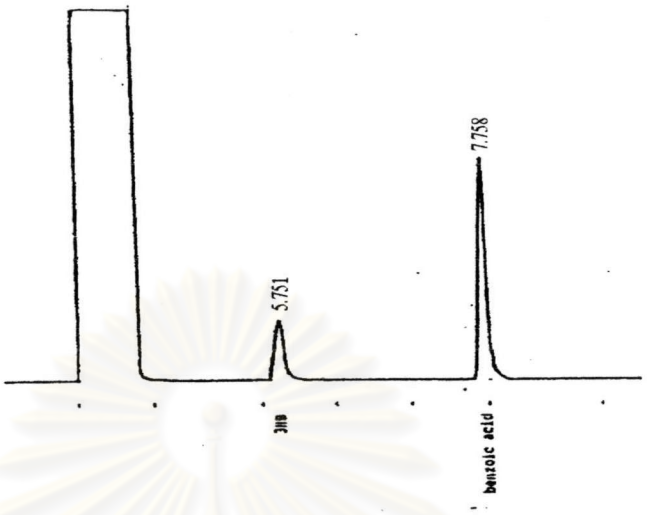
กราฟมาตรฐานโมโนเมอร์ 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ความเข้มข้น 0-5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความชันเท่ากับ 0.25

4. **กราฟมาตรฐานของแอมโมเนีย-ไนโตรเจน**

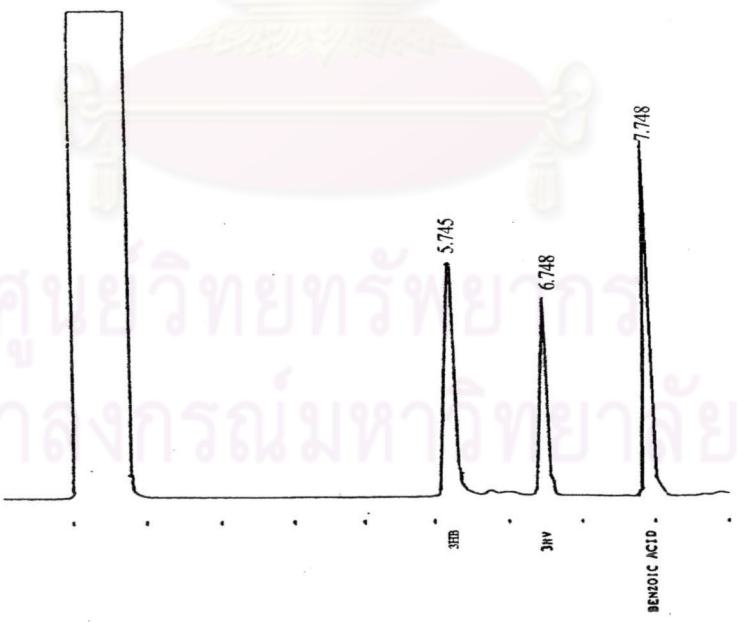


กราฟมาตรฐานของแอมเนียม-ไนโตรเจน ในช่วงความเข้มข้น 0-2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความชัน เท่ากับ 0.23

ตัวอย่างโครมาโตรแกรม

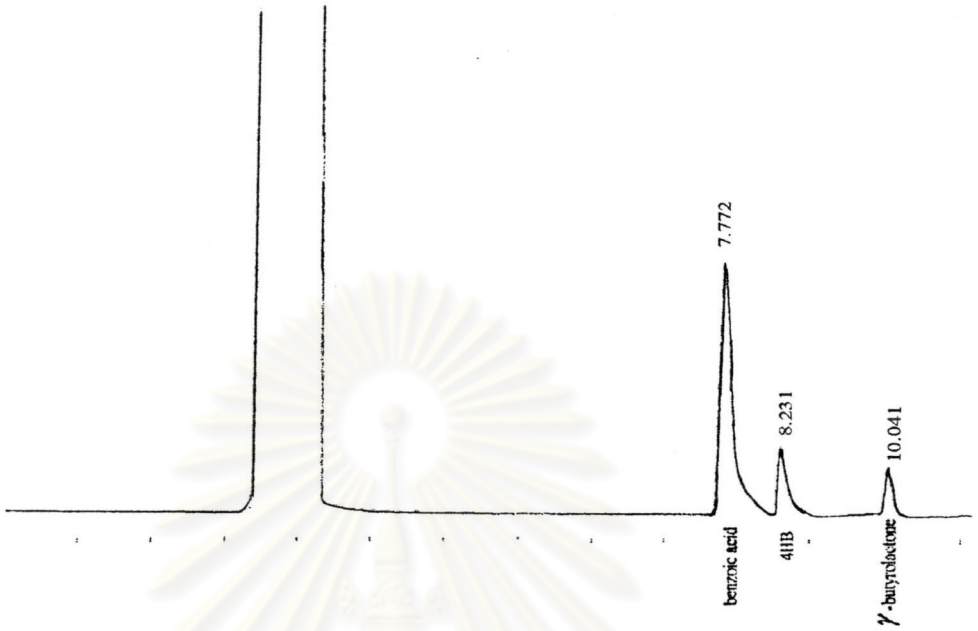


โครมาโตรแกรมของสารมาตรฐาน 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3HB) ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC

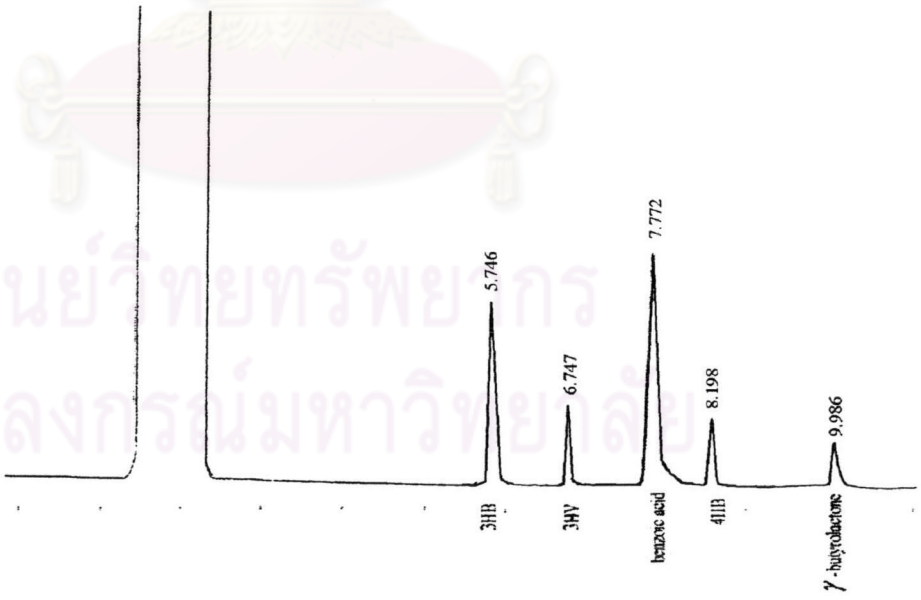


โครมาโตรแกรมของสารมาตรฐาน 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (3HV) ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โครมาโตรแกรมของสารมาตรฐาน 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (4HB) ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC



ตัวอย่างโครมาโตรแกรมของเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศศิพร โกมลเกษรักษ์ เกิดวันที่ 14 มีนาคม 2518 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาคชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง เมื่อปีการศึกษา 2539 จากนั้นเข้าทำงานในแผนกสิ่งแวดล้อมและความปลอดภัย บริษัท คาโอ อินดัสเตรียล (ประเทศไทย) จำกัด และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2542

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย