

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- เกียรติศักดิ์ คูหา. 2538. การกำจัดพลาสติกและการนำพลาสติกมาใช้ใหม่. วารสารพลาสติก. 12(2):61-69.
- กัญจนา ตระกูลคู. 2533. เทคโนโลยี พอลิเมอร์. หางหุ้นส่วนจำกัด เอ็กซ์เพรสมีเดีย กรุงเทพมหานคร.
- ชญัญ ผลประไพ. 2537. สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพอลิ บิตาไฮดรอกซีบิวทีเรต จาก *Alcaligenes* sp. สายพันธุ์ A-04 ในระดับถังหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เสาวรจน ช่วยจุลจินต. 2538. พอลิเมอร์ ชายน เลม 1. ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อัญชนา ศุรติขจร. 2537 การสร้างพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) โดย *Alcaligenes* sp. สายพันธุ์ A-04. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อรุณ ชาญชัยเชาววิวัฒน์. 2536. ลักษณะและการสร้างพอลิ-บิตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต โดย *Alcaligenes* sp. สายพันธุ์ A-04. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Abate, R., Ballistreri, A., and Montaudo, O. 1995. Separation and Structural Characterization of Cyclic and Open Chain Oligomers Produced in the Partial Pyrolysis of Microbial Poly (hydroxybutyrate). *Macromolecules*. 28:791-7916.
- Alderete, J.E., Karl, D.W. and Park, C.H. 1993. Production of poly(hydroxybutyrate) homopolymer and copolymer from ethanol and propanol in a fed-batch culture. *Biotechnol. Prog.* 9:520-525.
- An American National Standard. 1992. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastics Sheeting D882-91. *An Annual Book of ASTM Standards*. 08.02:316-324.
- Anderson, A.J. and Dawes, E.A. 1990. Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*. 54(4): 450-472.

- Asenjo, J.A., Schmidt, A.S., Andersen, P.R. and Andrews, B.A. 1995. Effect of Single Nutrient Limitation on Poly- β -Hydroxybutyrate Molecular Weight Distribution in *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Bioeng.* 46:497-502.
- 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.
- Bephist, J.N. (Grace, W.R. and Co.) 1959. US. patent 303659.
- Bephist, J.N. (Grace, W.R. and Co.) 1962. US. patent 3044942.
- 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 pp149-150.
- Bloembergen, S., Holden, D.A., Hamer, G.K., Bluhm, T.L. and Marchessault, R.H. 1986. Study of Bacterial Poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate). *Macromolecules.* 19:2865-2871.
- 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, Biocompatible, and Biodegradable Polyesters. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 41:77-93.
- Brivanese, C.A. and Sutherland, I.W. 1989. Polymer production by mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30:97-102.
- Byrom, D. 1994. Polyhydroxyalkanoates, pp.5-13. In : D.P. Mobley (ed.), *Plastic from microbed : microbial synthesis of polymers and polymer precursors*. Hanser Munich.
- Daniels, A.V., Chang, M.K.O., Andriano, K.P. and Heller, J. 1990. Mechanical properties of biodegradable polymers and composites propose for intenal fixation of bone. *J. Appl. Biomater.* 1:57-78.
- Dawes, E.A., Senior, P.J. 1973. The role and regulation energy reserve polymers inmicroorganisms. *Adv. Microbiol Physiol.* 10:135.

- Degelau, A., Scheper, T., Barley, Guske, C. 1995. Fluorometric measurement of poly- β -hydroxybutyrate in *Alcaligenes eutrophus* by flow cytometry and spectrofluorometry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42:653-657.
- Doi, Y., Tamaki, A., Kunioka, M., and Soga, K. 1987. Biosynthesis of terpolymers of 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyvalerate, and 5-hydroxyvalerate in *Alcaligenes eutrophus* from 5-chloropentanoic and pentanoic acids. *Makromol. Chem. Rapid Commun.* 8:631-635.
- Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y. and Soga, K. 1987. Biosynthesis of copolyester in *Alcaligenes eutrophus* H-16 from ¹³C-labelled acetate and propionate. *Macromolecules.* 20:2988-2991.
- Doi, Y., Tamaki, A., Kunioka, M. and Soga, K. 1988. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric acid and pentanoic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28:330-334.
- Doi, Y., and Kunioka, M. 1989. Biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced from gamma butyrolactone and butyric acid by *Alcaligenes eutrophus*. *Polym. Commun.* 30:169-170.
- Doi, Y. (ed) 1990. *Microbial Polyesters*. VCH, New York.
- Doi, Y. Segawa, A., Nakamura, S. Kunioka, M. 1992. In: Dawes EA. (ed) *Novel biodegradable microbial polymers*, 2nd. 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.
- 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.
- Egging, G., van der Wal, H., Huizberts, G.N.M., de Waard, P. 1993. Oleic acid as a substrate for poly 3-hydroxybutyrate formation in *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas putida*. *Ind. Crops. Prod.* 1:157-163.
- Evan, D.J. and Sikdar, K.S. 1990. Biodrgradable Plastic. *Chemtech.* 5:38-42.
- Findlay, R.H. and White, D.C. 1983. Polymeric beta-hydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:71-78.

- Flory, J.P. 1940. J.Am. Chem. Soc. 62:1561-1565.
- Galgut, P., Pitrola, R., Waite, I., Dayle, C. and Smith, R.. 1991. Histological evaluation of biodegradable and non-degradable membranes placed transcutaneously in rats. J Clin. Periodontol. 18:581-586.
- Gogolewski, S., Jovanovic, M., Perren, S.M., Dillon, J.G. and Hughes, M.K. 1993. Tissue responses and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: Polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/VA). J. Biomed. Mater. Res. 27:1135-1148.
- Gross, R.A., De Mello, C., Lenz, R.W., Brandl, H. and Fuller, R.C. 1989. Biosynthesis and characterization of poly(β -hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans*. Macromolecules. 22:1106-1115.
- 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.
- Holmes, P.A., Wright, L.F. and Collins, S.H. 1983. Eur. Pat. Appl. 0069497.
- Holmes, P.A. 1985. Application of PHB-a microbially produced biodegradable thermoplastic. Phys. Technol. 16:32-36.
- Holmes, P.A., 1988. Biologically produced (R)-3-hydroxyalkanoate polymers and copolymers, In Bassitt, D.C. (ed.). Developments in crystalline Polymers -2. Elsevier Applied Science Publishers. London. pp.1-65.
- Huffman, G.L., and Keller, D.J. 1973. The plastic issue. In:Guillet J. (ed) Polymers and Ecological Problems. Plenum. New York. London. p155.
- Ito, H., Marchessault R.H. and John Manley, R.St. 1991. Uniaxial deformation of P(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) gel films. Polymer. commun. 32(6):164-167.
- 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, B.S., Lee, S.C., Lee, S.Y., Chang, H.N., Chang, Y.K. and Woo, S.I. 1994. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus*. with glucose concentration control. Biotechnol. Bioeng. 43:892-898.

- Korsatko, W., Welengg, B., Tillian, H.M., Braunegg, G., and Lafferty, R.M. 1983. Poly-D-hydroxybutyric acid - a biologically degradable vehicle to regend release of a drug. Pharm. Ind. 45:1004-1007.
- Korsatko, W., Webnegg, B., Tillan, H.M., Egger, G., Pfragner, R.. and Walser, V. 1984. Poly D(-)-3-hydroxybutyric acid (poly-HBA) -a biodegradable former for long-term medication dossage. 3. Studies on compatibility of poly-HBA implantation tablets in tissue culture and animals. Pharm. Ind. 46:952-954.
- 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. 1989. Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. Appl. Microbiol. Bitechnol. 30:569-573.
- Kunioka, M. and Doi, Y. 1990. Thermal degradation of microbial copolyester : Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). Macromolecules. 23:1933-1936.
- Marchessault, R.H. , Bluhm, T.L., Deslandes, Y., Hamer, G.K., Orts, W.J., Sundanajien, P.J., Tayler, M.G., Bloembergen, S. and Holden, D.A. 1988. Poly(β -hydrodroxyalkanoates) : bioefinery polymers in search of application. Macro. Chem. Macromol. Symp. 19:235-254.
- Nakamura, S., Kunioka, M., Doi, Y. 1989. Macromolecular Rep., in press.
- Lce, S.Y. 1996. Review Bacterial Polymer alkanates. Biotechnol Bioeng. 49:1-14.
- Lemoigne, M. 1926. Production of dehydration and polymerization of β -hydrodroxybutyric acid. Bull. Soc. Chem. Biol. 8:770-782.
- Leversuch, R. 1987. Industry weighs the need to make polymer degradable. Mod. Pladtics 64:52-55.
- Oeding, V. and Schlegel, H.G. 1973. β -ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its sinificance in the regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism. Biochem. J. 134:239-248.
- Organ, S.J. and Barham, P. 1988. Electron microscopic investigations af the structure and nucleation of polyalkanoate copolymers and blends. Polym. Prepr. 29:602.

- Park, C.H. and Damodaram, V.K. 1994. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from ethanol and pentanol by *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Prog.* 10:615-620.
- Pearce, R. and Marchessault, R.H. 1994. Multiple melting in blends of isotactic and atactic poly(β -hydroxybutyrate). *Polymer.* 35(18):3990-3997.
- Reusch, R.N., Spanow, A.W., Gardiner, J. 1992. Transport of poly- β -hydroxybutyrate in human plasma. *Biochem. Biophys. Acta.* 1123:33-40.
- Scandola, M., Geccorulli, and Doi, Y. 1990. Viscoelastic relaxations and thermal properties of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Int. J. Biol. Macromol.* 12:112-117.
- Scandola, M., Geccorulli, G., Pizzoli, M. and Gazzano, M. 1992. Study of the Crystal Phase and Crystallization Rate of Bacterial Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Macromolecules.* 25:1405-1410.
- Shi, F., Gross, R.A. and Rutherford, D.R. 1996. Microbial Polyester Synthesis : Effects of Poly(ethylene glycol) on Product Composition, Repeat Unit Sequence, and End Group Structure. *Macromolecules.* 29:10-27.
- Srienc, F., Arnold, B. and Bailey, J.E. 1984. Characterization of intracellular accumulation of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) in individual cells of *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Bioeng.* 30:569-573.
- Suzuki, T., Yamane, T. and Shimizu, S. 1986. Mass production of poly- β -hydroxybutyric acid by fully automatic fed-batch culture of methylotroph. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23:322-329.
- 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.

- Tanaka, K. and Ishizaki, A. 1995. Production of poly(D-3HB) from CO₂, H₂ and O₂ by High Cell Density Autotrophic Cultivation of *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Bioeng.* 45:268-275.
- Valentin, H.E., Schonebaum, A. and Steinbuchel, A. 1992. Identification of 4-hydroxyvaleric acid as a constituent in biosynthetic poly-hydroxyalkanoic acids from bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:507-514.
- Valentin, H.E., Lee, E.Y. and Steinbuchel, A. 1994. Identification of 4-hydroxyhexanoic acid as a new constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40:710-716.
- Wallen, L.L. and Rohedder, W.K. 1974. Poly- β -hydroxyalkanoate from activated sludge. *Environ. Sci. Technol.* 8:576-579.
- Williamson, D.H. and Wilkinson, J.F. 1958. *J. Gen. Microbiol.* 19:198.
- Yamane, T. 1993. Yield of Poly-D(-)-3-Hydroxybutyrate from Various Carbon Source : A Theoretical Study. *Biotechnol. Bioeng.* 41:165-170.
- Yoshie, N., Menju, H., Sato, H. and Inoue, Y. 1995. Complex Composition Distribution of Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Macromolecules.* 28:6516-6521.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การศึกษาปริมาณฟรักโทสและแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในอาหารเพื่อการผลิต (ขั้นตอนที่ 1)

วิธีการเลี้ยงเชื้อในอาหารเพื่อการผลิตแบบ 2 ขั้นตอน เป็นวิธีซึ่งได้รับการปรับปรุงโดย Doi และ Sawaguchi (1990) (อ้างถึงใน Doi, 1990) เนื่องจากการผลิตโคพอลิเมอร์ในระดับอุตสาหกรรมประสบปัญหาในการเตรียมกล้าเชื้อปริมาณมาก เพื่อให้พอเพียงสำหรับการใช้เป็นเซลล์เริ่มต้นในขั้นตอนการผลิตซึ่งใช้แหล่งคาร์บอนบางชนิดเป็นกรด ดังนั้นเพื่อให้สามารถใช้เซลล์เริ่มต้นปริมาณน้อยลงจึงแบ่งขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อในอาหารเพื่อการผลิตเป็น 2 ขั้นตอน โดยขั้นที่ 1 เป็นการเพิ่มปริมาณเซลล์ด้วยการเติมฟรักโทสหรือกลูโคส และแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณที่เหมาะสม (ทำให้อยู่ในภาวะการเลี้ยงเชื้อที่สารอาหารมีความสมดุล) เพื่อให้เซลล์ใช้แหล่งคาร์บอนดังกล่าวเพื่อการเจริญเติบโตมิใช่เพื่อนำไปใช้สังเคราะห์ PHB (พบว่ามีการนำไปใช้สังเคราะห์ PHB แต่เป็นปริมาณน้อย) เมื่อเลี้ยงเชื้อจนได้ปริมาณเซลล์มากพอ จึงเติมแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์ (ทำให้อยู่ในภาวะการเลี้ยงเชื้อที่สารอาหารขาดความสมดุลกล่าวคือ มีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินไปในขณะที่แหล่งไนโตรเจนถูกจำกัด) โดยมีการศึกษาแล้วว่า PHB ที่ถูกสร้างขึ้นในขั้นตอนแรกของการเลี้ยงเชื้อจะถูกนำไปใช้เมื่อเลี้ยงเชื้อให้อยู่ภาวะสารอาหารและโคพอลิเมอร์จะถูกสร้างขึ้นมาแทน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาวิธีการเลี้ยงเชื้อในอาหารเพื่อการผลิตแบบ 2 ขั้นตอนโดยใช้วิธีการดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น เป็นแนวทางในการศึกษา จึงศึกษาหาปริมาณฟรักโทส และแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อขั้นตอนที่ 1 วิธีการคือ จากรูปแบบการเติบโตของ *Alcaligenes* sp. A-04 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อชุดควบคุม (ดังแสดงในรูปที่ 12) เลือกกล้าเชื้ออายุต่าง ๆ มาเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต (ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.3) ซึ่งมีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัมต่อลิตร แปรผันปริมาณฟรักโทส 5 10 และ 15 กรัมต่อลิตร เพื่อหาช่วงความเข้มข้นของฟรักโทสที่เหมาะสม พบว่ากล้าเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 อายุ 16 ชั่วโมงเชื้อมีการเติบโตในอาหารเพื่อการผลิตดีที่สุด และมีการเติบโตได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดไม่แตกต่างกันในทุกความเข้มข้นของปริมาณฟรักโทส (1.26 1.30 และ 1.24 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ดังนั้นจึงเลือกศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสมของฟรักโทสในช่วง 5 กรัมต่อลิตร การทดลองต่อมาเป็นการหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยเลือกแปรผันในช่วง 0.2 และ 0.3 ต่อปริมาณฟรักโทส 3 4 5 และ 6 กรัมต่อลิตร พบว่า *Alcaligenes* sp. A-04 อายุกล้าเชื้อ 16 ชั่วโมงจากอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อชุดควบคุม เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 0.3 กรัมต่อลิตร และเติมฟรักโทส 5 กรัมต่อลิตร

มีการเติบโตได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 1.96 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 36 โดยเป็นกล้าเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิต PHA 50 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (ในระยะเวลาการผลิตสูงสุดชั่วโมงที่ 48) และสามารถใช้ฟรักโทสจนหมดก่อนชั่วโมงที่ 36 ซึ่งทำให้สามารถเติมแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตขั้นตอนที่ 2 ได้ในขณะที่เชื้อมีการเติบโตสูงสุด (ในช่วงเวลาที่ 36) และก่อนถึงระยะเวลาการผลิตสูงสุด จึงเลือกปริมาณฟรักโทส และแอมโมเนียมซัลเฟตดังกล่าวให้เป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อในอาหารเพื่อการผลิตขั้นตอนที่ 1

ภาคผนวก

การเตรียมกราฟมาตรฐาน สูตรอาหาร และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. การเตรียมกราฟมาตรฐานระหว่าง OD_{600} กับน้ำหนักเซลล์เปียก และ OD_{600} กับน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ของ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมหัวเชื้อของ *Alcaligenes* sp. A-04 ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น โดยวัดค่า $OD_{600} = 0.35-0.40$ นาโนเมตร ภายเชื้อ 1 มิลลิลิตร (2% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อจนได้อายุเชื้อที่ต้องการ ตวงน้ำหมักปริมาตร 10, 20, 40, 60, และ 80 มิลลิลิตร ปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำเซลล์มาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำแต่ละตัวอย่างมาเจือจางให้ได้ค่า OD_{600} ในช่วง 0.1-0.6 บันทึกผลการทดลองปิเปตตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร กรองผ่านเมมเบรน 0.45 ไมครอนที่ทราบน้ำหนักเปียกและแห้งแล้ว นำมาชั่งหาน้ำหนักเซลล์เปียก (กรัมต่อลิตร) แล้วยนำไปอบแห้งจนน้ำหนักคงที่ เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) นำค่าที่ได้สร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง OD_{600} กับน้ำหนักเซลล์เปียก (กรัมต่อลิตร) และ OD_{600} กับน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

2. การเตรียมกราฟมาตรฐานระหว่าง OD_{600} กับน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ของ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต MSM

ภายเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 จากอาหารสำหรับเตรียมกล้าเชื้อ 1 มิลลิลิตร (2% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 60 ชั่วโมง ตวงน้ำหมักปริมาตร 10, 20, 40, 60 และ 80 มิลลิลิตร ปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำเซลล์มาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำแต่ละตัวอย่างมาเจือจางให้ได้ค่า OD_{600} ในช่วง 0.1-0.6 บันทึกผลการทดลองปิเปตตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร กรองผ่านเมมเบรน 0.45 ไมครอนที่ทราบน้ำหนักแห้งแล้ว นำไปอบแห้งจนน้ำหนักคงที่ เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) นำค่าที่ได้สร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง OD_{600} กับน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

3. สูตรอาหารเพื่อการผลิตตามรายงานของ Doi และคณะ (1992)

อาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

โคโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	5.8	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	3.7	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.12	กรัม
ซีเตรต	5	กรัม
สารละลาย trace element	1	มิลลิลิตร

สารละลาย trace element ใน 1M HCl 1 ลิตรประกอบด้วย

แคลเซียมคลอไรด์	1.67	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	2.78	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.29	กรัม
แมงกานีสไดคลอไรด์เตตระไฮเดรต	1.98	กรัม
คอปเปอร์ไดคลอไรด์ไดไฮเดรต	0.17	กรัม

แยกละลาย แกลือ , แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต และ trace element เมื่อละลายแล้ว จึงนำมารวมกัน ปรับ pH เป็น 7.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3.0 โมลาร์ หนึ่งมาเชื่อแบบมาตรฐาน

4. วิธีเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA reagent)

โดยละลาย 1.0 กรัมของกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมนโปแตสเซียมโซเดียมคาร์เตรต 30.0 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา

5. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียม

สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เตรียมโดยละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ 150 กรัมในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร

สารละลายไนโตรพัสซายด์ เตรียมโดยละลายฟีนอล 7 กรัมและโซเดียมไนโตรพัสซายด์ 34 มิลลิกรัมในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °ซ

สารละลายบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรท์ เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.480 กรัมในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 70 มิลลิลิตร เติมไดโซเดียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต 4.98 กรัม และเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (5-5.25%) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 11.4-12.2 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย EDTA เตรียมโดยละลายเกลือของ EDTA ไดโซเดียม (EDTA disodium salt) 6 กรัมในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

สูตรคำนวณ

1. การคำนวณน้ำหนักเซลล์เปียก (กรัมต่อลิตร)

$$\text{สูตร น้ำหนักเซลล์เปียก (กรัมต่อลิตร)} = \text{ความชื้น} \times \text{OD}_{600} \times \text{ค่าการเจือจาง}$$

2. การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

$$\text{สูตร น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \text{ความชื้น} \times \text{OD}_{600} \times \text{ค่าการเจือจาง}$$

3. การคำนวณปริมาณฟรักโทสในอาหาร (กรัมต่อลิตร)

$$\text{สูตร ปริมาณฟรักโทส (กรัมต่อลิตร)} = \text{ความชื้น} \times \text{OD}_{540} \times \text{ค่าการเจือจาง}$$

4. การคำนวณปริมาณแอมโมเนียมในอาหาร (กรัมต่อลิตร)

$$\begin{aligned} \text{สูตร ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)} &= \text{OD}_{630} \times \text{ความชื้น} \times (1/1000) \\ &\times (\text{ค่าการเจือจาง}/5) \times (132/28) \end{aligned}$$

หมายเหตุ

28 คือ น้ำหนักโมเลกุลของธาตุไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟต

132 คือ น้ำหนักโมเลกุลของธาตุแอมโมเนียมซัลเฟต

6. การคำนวณปริมาณ PHB โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร

$$\text{สูตร ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{OD}_{235} \times 3 \times \text{ค่าการเจือจาง}}{\text{ความชื้น} \times 10 \times 5}$$

7. การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ (กรัมต่อลิตร) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี

การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ของ 3HB, 3HV และ 4HB (กรัมต่อลิตรต่อ lyophilized cell 0.02 กรัม) ทำการประมวลผลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Star chromatogram : Version 4.02 ซึ่งจะทำการคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ (กรัมต่อลิตร) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในสถานะเดียวกัน

การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์แต่ละชนิด (กรัมต่อลิตร)

$$\text{ปริมาณ โมโนเมอร์ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าจากการวิเคราะห์ (g/l)} \times \text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)}}{20 \times 1.10}$$

หมายเหตุ ค่าคงที่ 1.10 คือค่า correlation factor ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งโดยการอบต่อน้ำหนักเซลล์แห้งโดยการระเหิดแห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ

$$(\text{cell dry weight} = \text{lyophilized weight} \times 1.10)$$

8. การคำนวณสัดส่วน (โมลเปอร์เซ็นต์) ของแต่ละโมโนเมอร์ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี

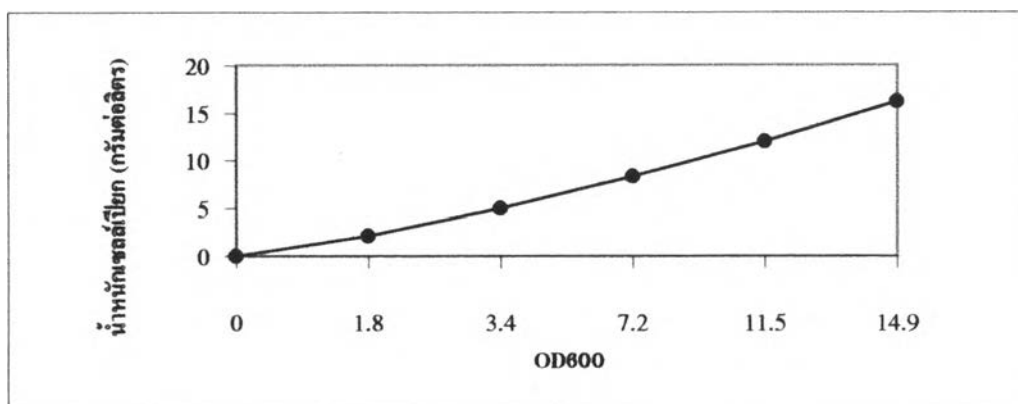
สูตร การคำนวณสัดส่วนองค์ประกอบของโมโนเมอร์ในเทอร์พอลิเมอร์ (mole fraction)

1. ค้นหาปริมาณของแต่ละโมโนเมอร์ (กรัมต่อลิตร)
 2. ค้นหาจำนวนโมลของแต่ละโมโนเมอร์ โดยการหารด้วยน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละโมโนเมอร์ (น้ำหนักโมเลกุลของ 3HB 3HV และ 4HB = 86 100 และ 86 ตามลำดับ)
 3. ค้นหาสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) ดังนี้
- $$\text{โมลเปอร์เซ็นต์ของแต่ละโมโนเมอร์} = \frac{\text{จำนวนโมลของโมโนเมอร์} \times 100}{\text{ผลรวมของจำนวนโมลของโมโนเมอร์ทั้งหมด}}$$

ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐาน

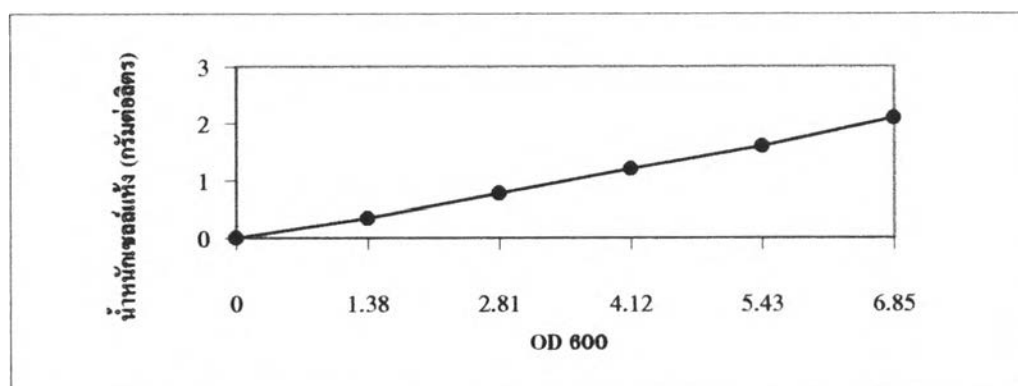
1. กราฟมาตรฐานระหว่าง OD 600 กับ น้ำหนักเซลล์เปียก (กรัมต่อลิตร)



รูปที่ 31 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำหนักเซลล์เปียก (กรัมต่อลิตร)

ค่าความชัน เท่ากับ 1.069

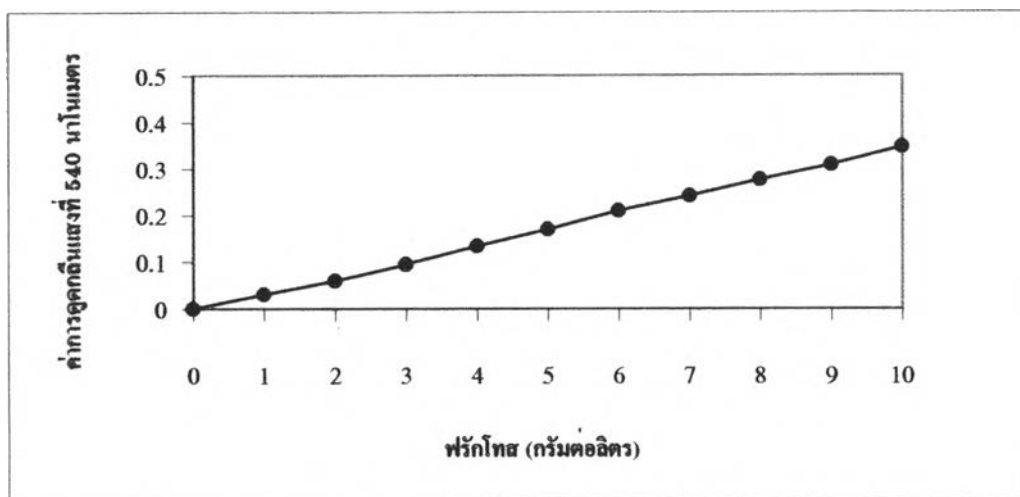
2. กราฟมาตรฐานระหว่าง OD 600 กับ น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)



รูปที่ 32 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

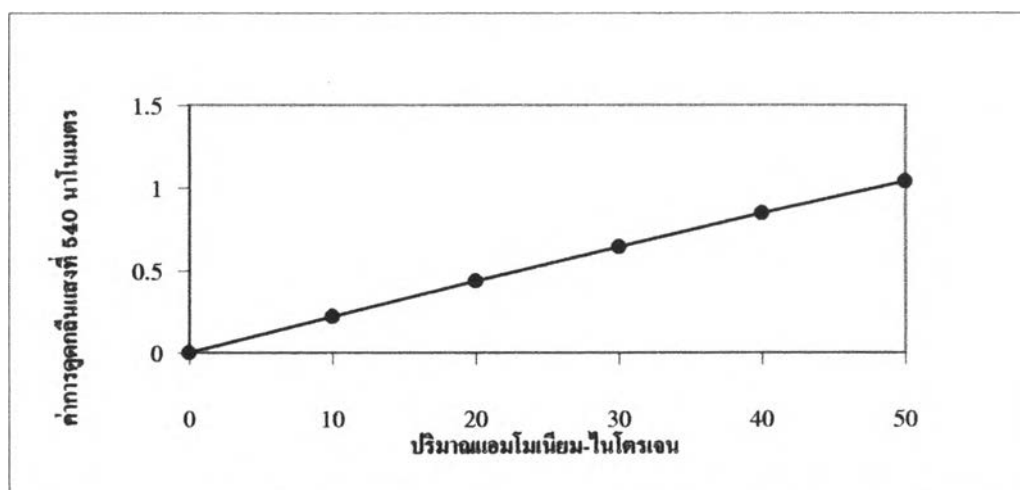
ค่าความชัน เท่ากับ 0.292

3. กราฟมาตรฐานของ ฟรักโทส ด้วยวิธี DNSA



รูปที่ 33 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณฟรักโทสในช่วงความเข้มข้น 0-10 กรัมต่อลิตร
ค่าความชัน เท่ากับ 3.33×10^{-4}

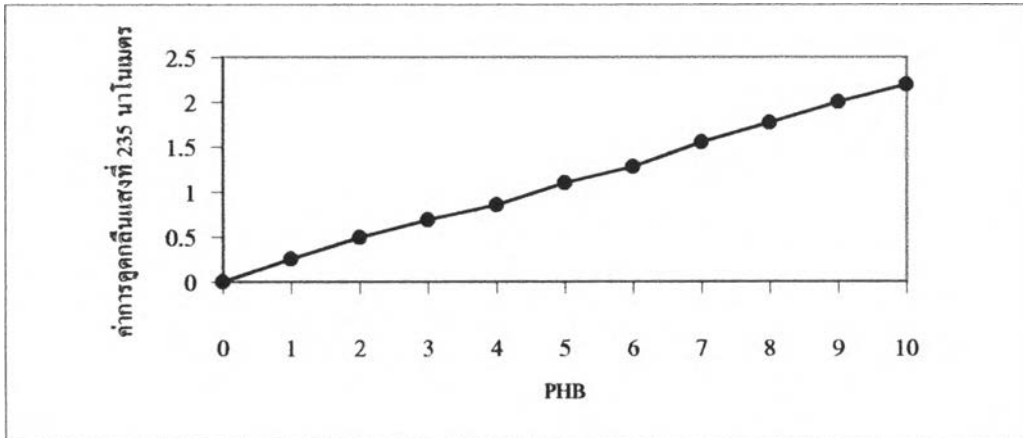
4. กราฟมาตรฐานของ แอมโมเนียม-ไนโตรเจน



รูปที่ 34 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ในช่วงความเข้มข้น
0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

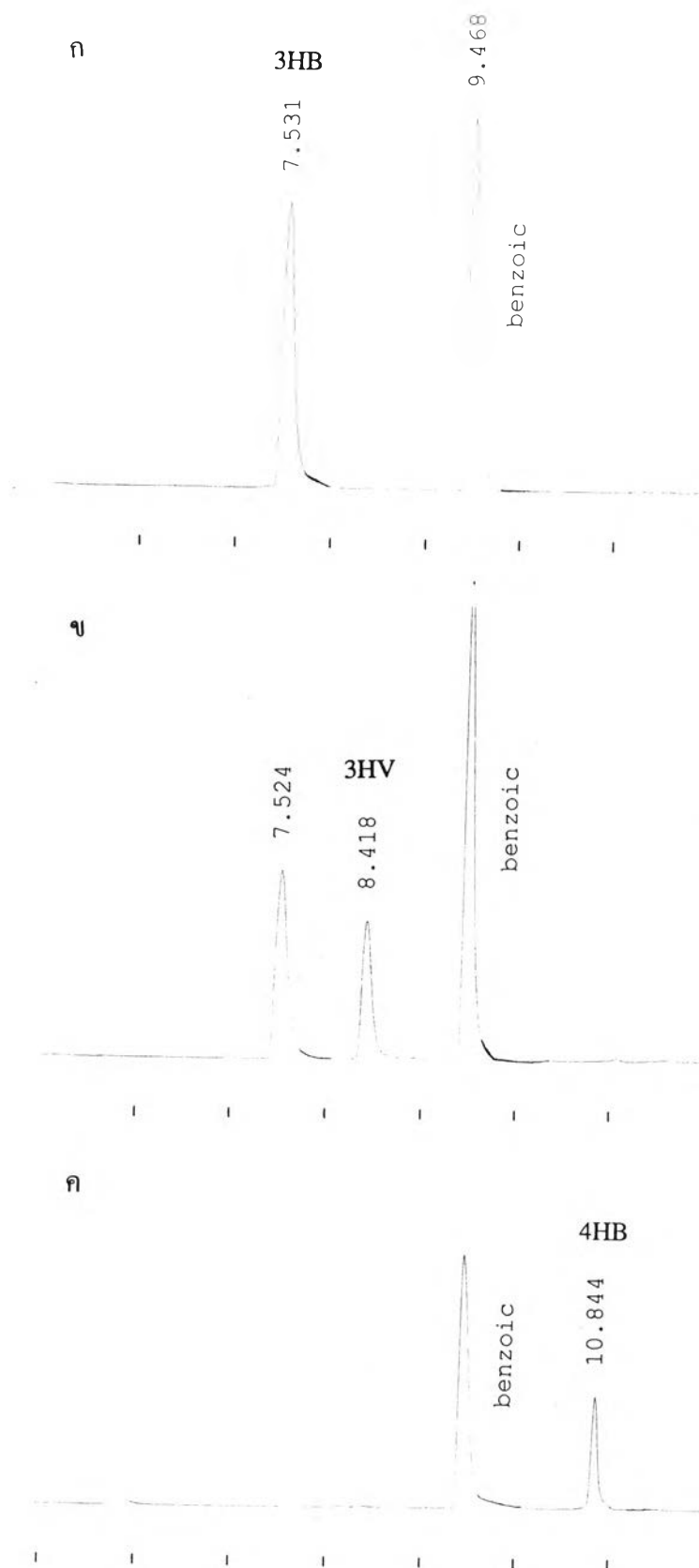
ค่าความชัน เท่ากับ 0.022

5. กราฟมาตรฐาน PHB

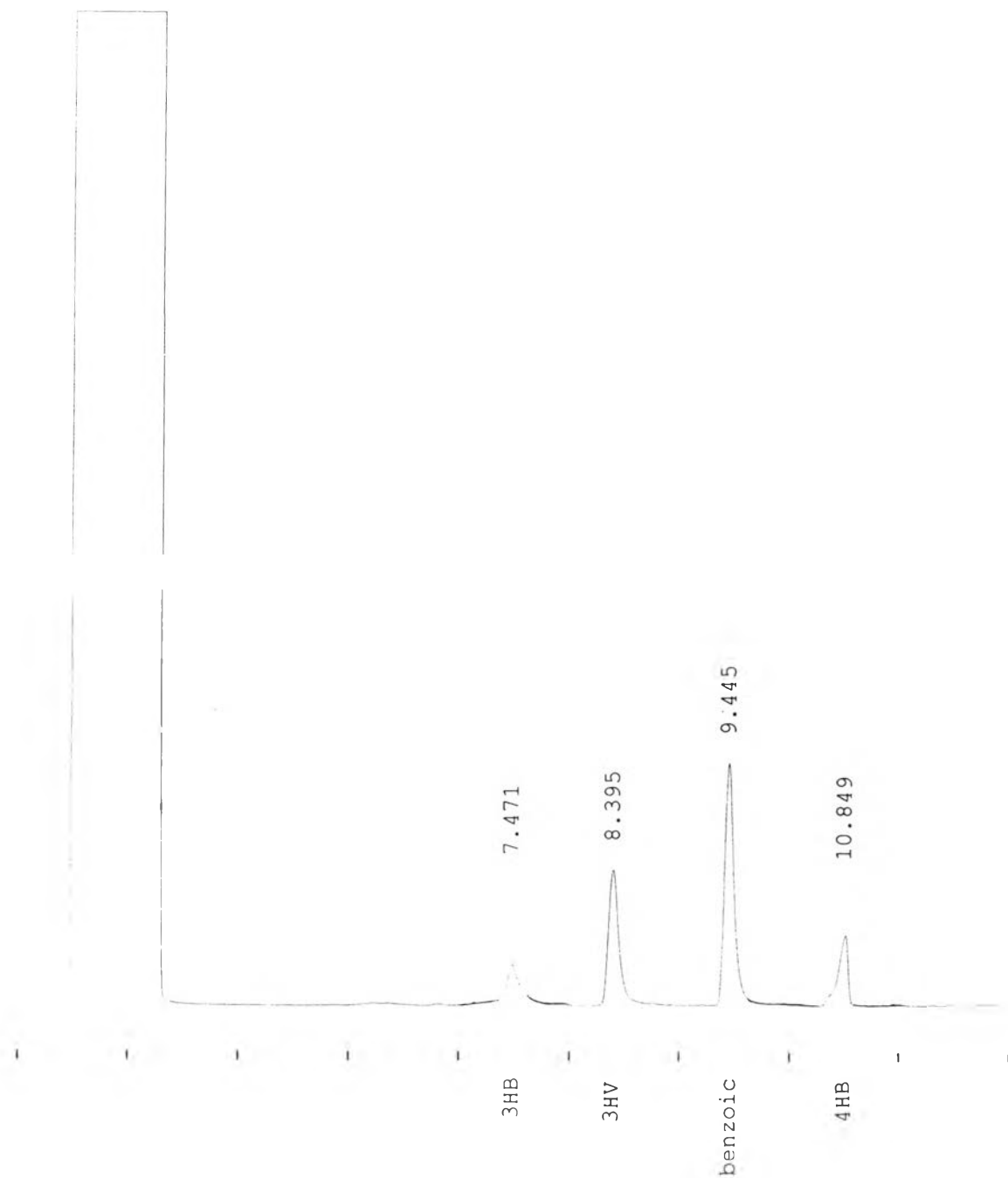


รูปที่ 35 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ PHB ในช่วงความเข้มข้น 0-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

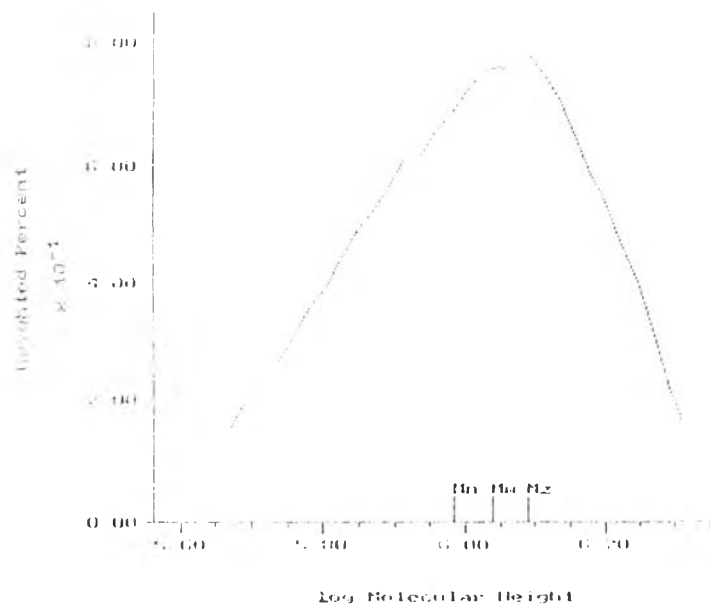
ค่าความชัน เท่ากับ 0.22



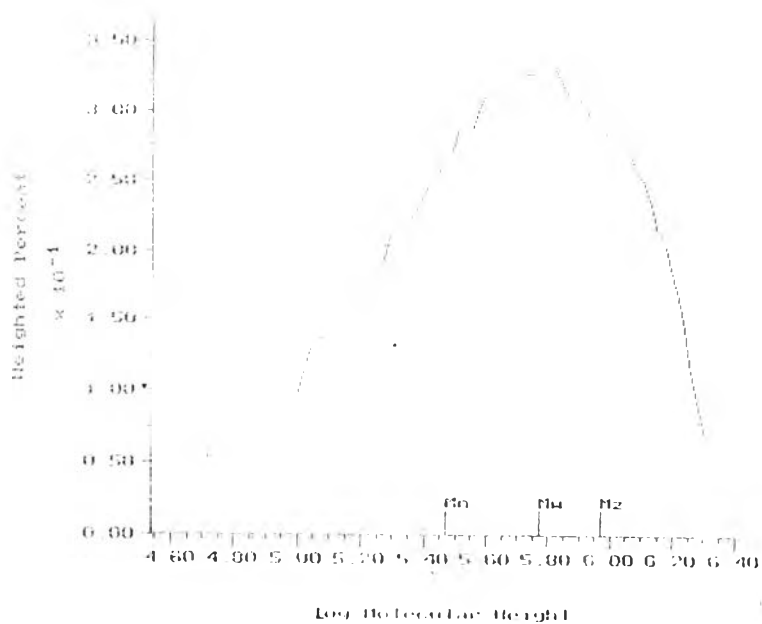
รูปที่ 36 โครมาโตแกรมสารมาตรฐาน 3HB (ก) 3HV (ข) และ 4HB (ค) ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี GC



รูปที่ 37 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) จาก *Alcaligenes* sp. A-04 ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี GC

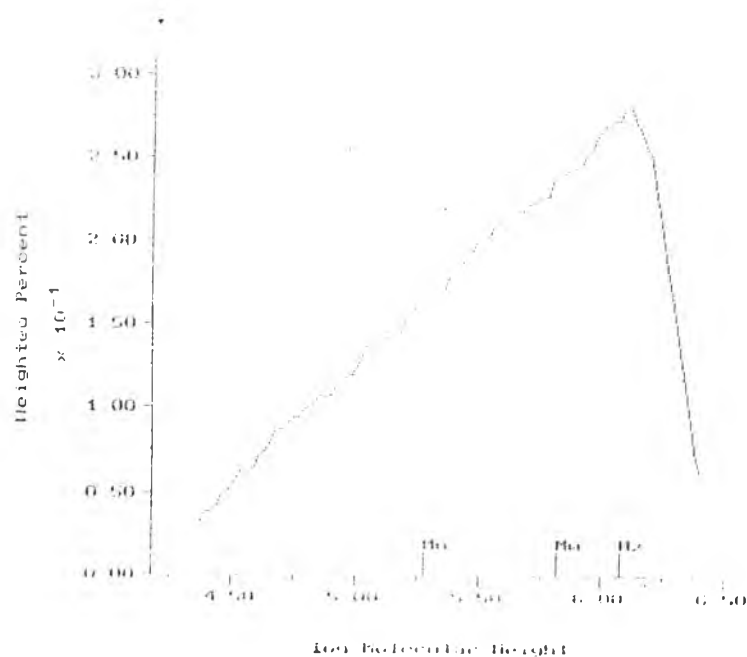


P(10%3HB-co-40%3HV-co-50%4HB)

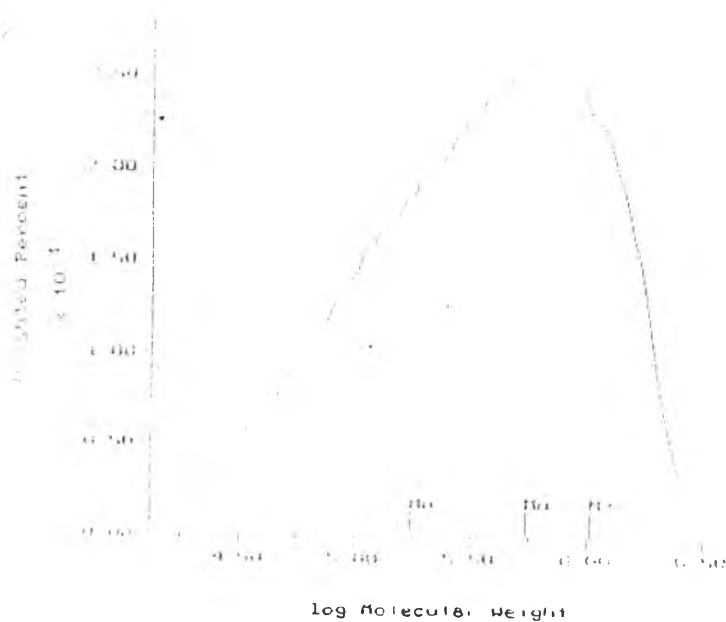


P(11%3HB-co-34%3HV-co-55%4HB)

รูปที่ 38 โครมาโตแกรมของเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB จาก *Alcaligenes* sp. A-04) ที่มีสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์แตกต่างกัน ซึ่งทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยและค่า PDI ด้วยเครื่อง GPC

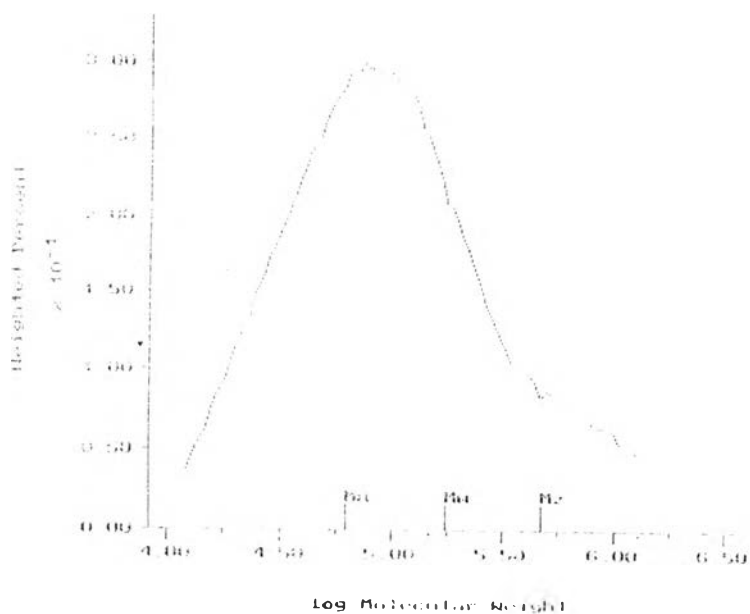


P(11%3HB-co-23%3HV-co-66%4HB)

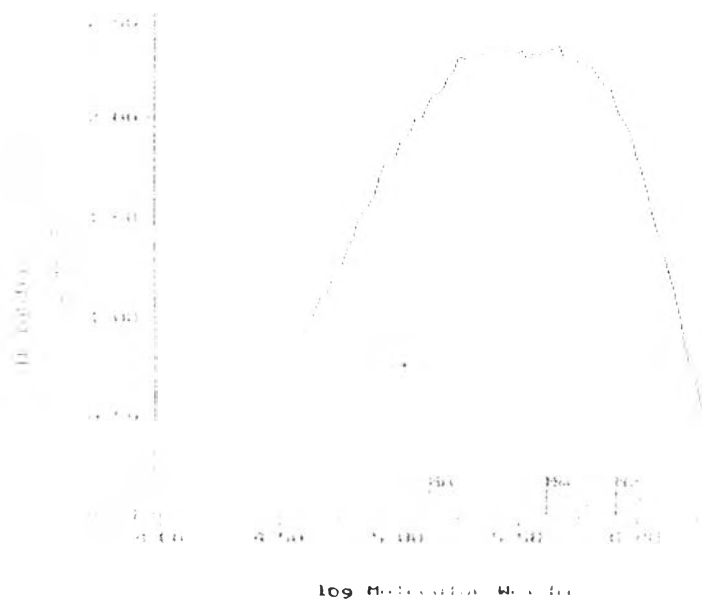


P(12%3HB-co-12%3HV-co-76%4HB)

รูปที่ 38 (ต่อ) โครมาโตแกรมของเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB จาก *Alcaligenes* sp. A-04) ที่มีสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์แตกต่างกัน ซึ่งทำการวิเคราะห์หาหน้าหนัก โมเลกุลเฉลี่ยและค่า PDI ด้วยเครื่อง GPC



P(10%3HB-co-6%3HV-co-84%4HB)



P(4%3HB-co-3%3HV-co-93%4HB)

รูปที่ 38 (ต่อ) โครมาโตแกรมของเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB จาก *Alcaligenes* sp. A-04) ที่มีสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์แตกต่างกัน ซึ่งทำการวิเคราะห์หาหน้าหนัก โมเลกุลเฉลี่ยและค่า PDI ด้วยเครื่อง GPC

ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุชาดา จันทร์ประทีป เกิดวันที่ 29 กันยายน พ.ศ. 2515 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อปีการศึกษา 2535 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2536

