รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์. ลักษณะและการสร้าง โพลี-เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทีเรท โดย *Alcaligenes* sp. A-04. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2536.

ภาษาอังกฤษ

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

Anderson, A.J., and Dawes, A. Occurence, Metabolism, Metabolic role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Microbiological Rev. 54(1990) : 450-472.

Ballard, D.G.H., Holmes, P.A., and Senior, P.J. Formation of polymers of β-hydroxybutyric acid in bacterial cell and a comparison of the morphology of growth with the formation of polyethylene in the solid state. In M. Fontanille and A. Guyot (ed.) Recent advances in mechanistic and synthetic aspects of polymerization. 215 (1987) : 239-314.

Berger, E., Ramsay, B.A., Ramsay, J.A., and Chavarie, C. PHB recovery by hypochlorite digestion of non PHB biomass. Biotechnol.Tech. 3(1989) : 227-232.

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

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

Bloembergen , S. Characterization of bacterial poly(β-hydroxybutyrate-co-β-hydroxyvalerate and synthesis of analoques via a non biochemical approach. Thesis , University of Waterloo, 1987.

Bloembergen, S., Holden, D.A., Hamer, G.K., Bluhm, T.L., and Marchessault, R.H. Studies of composition and crystallinity of bacterial poly(β-hydroxybutyrate-co-β-hydroxyvalerate)Macromolecules 19(1986) : 2865-2871.

Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W. and Fuller, R.C. Plastic from bacteria : Poly(β-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible and biodegradable polymers. Adv.Biochem.Eng. 41(1990) : 78-79.

Brivonese, C.A. and Sutterland, I.W. Polymer production by mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30 (1989) : 97-102.

Byrom, D. Polymer synthetsis by microorganisms:technology and economic Tibtech. 5(1987) : 246-250.

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

Dawes, E.A., and Senior, P.J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganism. Adv.Microb.Physiol. 10(1973):135-266

Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y. and Soga, K. Nuclear Magnatic Resonanse studies on Unusual Bacterial copolyester of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate. Macromolecules . (1988) : 2722-2727.

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

Ellar, D., Lundgren, D.G., Okamura, K., and Marchessault, R.H. Morphology of poly-β-hydroxybutyrate granules. J. Mol. Biol. 35(1968) : 489-502.

Emeruwa, A.C., and Hawirko, R.Z. Poly-β-hydroxybutyrate metabolism during growth and sporulation of *Clostridium botulinum* J. Bacteriol. 116(1973) : 988-993.

Evan,D.J. and Sikda, K.S. Biodegradable plastic . Chemtech. 5 (1990) : 38-42.

Findley, R.H., and White, D.C. Polymeric batahydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillusmegaterium*. Appl. Environ.Microbiol. 51 (1983) : 71-78.

Groom,C.A., Luong, J.H.T., and Mulchandani, A. On-line culture fluorescence measurment during the batchcultivation of poly-β-hydroxybutyrate producing *Alcaligenes eutrophus*. J. Biotechnol. 8(1988) : 271-278.

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

Howells, E.R. Single cell protein and related technology. J.Chem. Ind. (1982) : 508-511.

Jackson, E.A., and Dawes, E.A. Regulation of tricarboxylic acid cycle and poly-β-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* grown under nitrogen and oxygen limitation. J. Gen. Microbiol. 97(1976) : 303-312.

Kempers, A.J. Determination of sub-microquantities of ammonuim and nitrates in soils with phenol, sodium nitroprusside and hypochlorite. Geoderma 12(1974) : 201-206.

King, P.P. Biotechnology. An industrial view. J. Chem. Tecnol. Biotechnol. 32(1982) : 2-8.

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

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall,R.J. Protein measurment with Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193 (1951) : 265-275.

Mas, J., Pedros-Alio, C., and Guerrero, R. Mathametical model for determining the effects of intracytoplasmic inclusions on volumn and density of microorganisms. J. Bacteriol. 164(1985) : 749-756.

Mulchandani, A., Luong, J.H.T,and Groom. C. Substrate inhibition kinetic for microbialgrowth andsynthesis of poly-β-hydroxybutyricacid by *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30 (1989): 11-17.

Nagai, S., Nishizawa, Y., Onodera, M., and Aiba, S. Effect of dissolved oxygen on growth yeild and aldolase activity in chemostat culture of *Azotobacter vinelandii* . J. Gen. Microbiol. 66 (1971) : 197-203.

Nagai, S., and Aiba, S. Kinetics of the growth yield as affected by dissolved oxygen in a chemostat culture of *Azotobacter vinelandii* . Ferment. Technol. (1972) : 143-145.

Nakata, H.M. Effect of pH on intermediates produced during growth and sporulation of *Bacillus cereus.* J. Bacteriol. (1963) : 577-581.

Odham , G., Tunlid, A., Westerdahl, G., and Marden,P.Combined determination of poly-β-hydroxyalkanoic and cellular fatty acids in starved marinebacteria and serwage by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometry detection. Appl. Environ. Microbiol. 52 (1986) : 905-910.

Page, W.J. Production of poly-β-hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD in media containing sugars and complex nitrogen sources. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38(1992) : 117-121.

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

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

Rees, G.N., Vasilaidis, G., May, J.W., and Bayly, R.C. Production of poly-β-hydroxybutyrate in *Acinetobacter* spp. isolated from activated sludge. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38(1993) : 734-737.

Repaske, R. Nutritional requiment for *Hydrogenomonas eutropha* J. bacteriol. 83(1962) : 418-422.

Repaske, R., and Repaske, A.C. Quantitative requiment for exponential growth of *Alcaligenes eutrophus*. Appl. Environ. Microbiol. 32(1976) : 585-591.

Schlegel, H.G., Gottschalk, G., and Bartha, R. Formation and utilization of PHB by Knallgas bacteria. Nature 191(1961) : 463-465.

Senior, P.J., and Dawes, E.A. The regulation of poly-β-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. Biochem. J. 134 (1973) : 225-238.

Senior, P.J., Beech, G.A., Richie, G.A.F., and Dawes, E.A. The role of oxygen limitation in the formation of poly-β-hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. J. Biochem. 128 (1972) : 1193-1201.

Senior, P.J., and Dawes, E.A. Poly-β-hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii* Biochem. J. 125(1971) : 55-66.

Sonnleitner, B., Heinzle, E., Braunegg, G., and Lafferty R.M. Formal kinetics of poly-β-hydroxybutyric acid (PHB) production in *Alcaligenes eutrophus* H16 and *Mycoplana rubra* R14 with respect to the dissolved oxygen tension in ammonium-limited batch cultures. Eur. J. Appl. Microbiol. 7(1979) : 1-10.

Steinbuchel, A. and Schlegel, H.G. Excretion of pyruvate by mutants of *Alcaligenes eutrophus*, which are impared in the accumulation of poly(β-hydroxybutyric acid) (PHB) under conditions permitting synthesis of PHB. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31 (1989) : 168-175.

Stevenson, L.H., and Socolofsky, M.D. Cyst formation and poly-β-hydroxy butyric acid accumulation in *Azotobacter* J. Bacteriol. 91 (1966) : 304-310

Stockdale, H., Ribbons, D.W., and Dawes, E.A. Occurence of poly-β-hydroxybutyrate in the *Azotobacteriaceae*. J. Bacteriol. 95 (1968) : 1798-1803.

Suzuki, T., Seguchi,H., Yamane,T., Shimizu, S. and Gekko, K. Control of molecular weight produced in fed-batch culture of *Protomonas extorquens* . Appl. Microbiol. Biotechnol. 27(1988) : 487-491.

Suzuki, T., Yamane, T., Shimizu, S. Kinetic and effect of nitrogen source feeding production of poly-β-hydroxybutyric acid by fed-batch culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24 (1986a) : 366-369.

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

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

Wallen, L.L., and Rohwedder, W.R. Poly-β-hydroxyalkanoate from activated sludge. Environ. Sci. Technol. 8(1974) : 576-579.

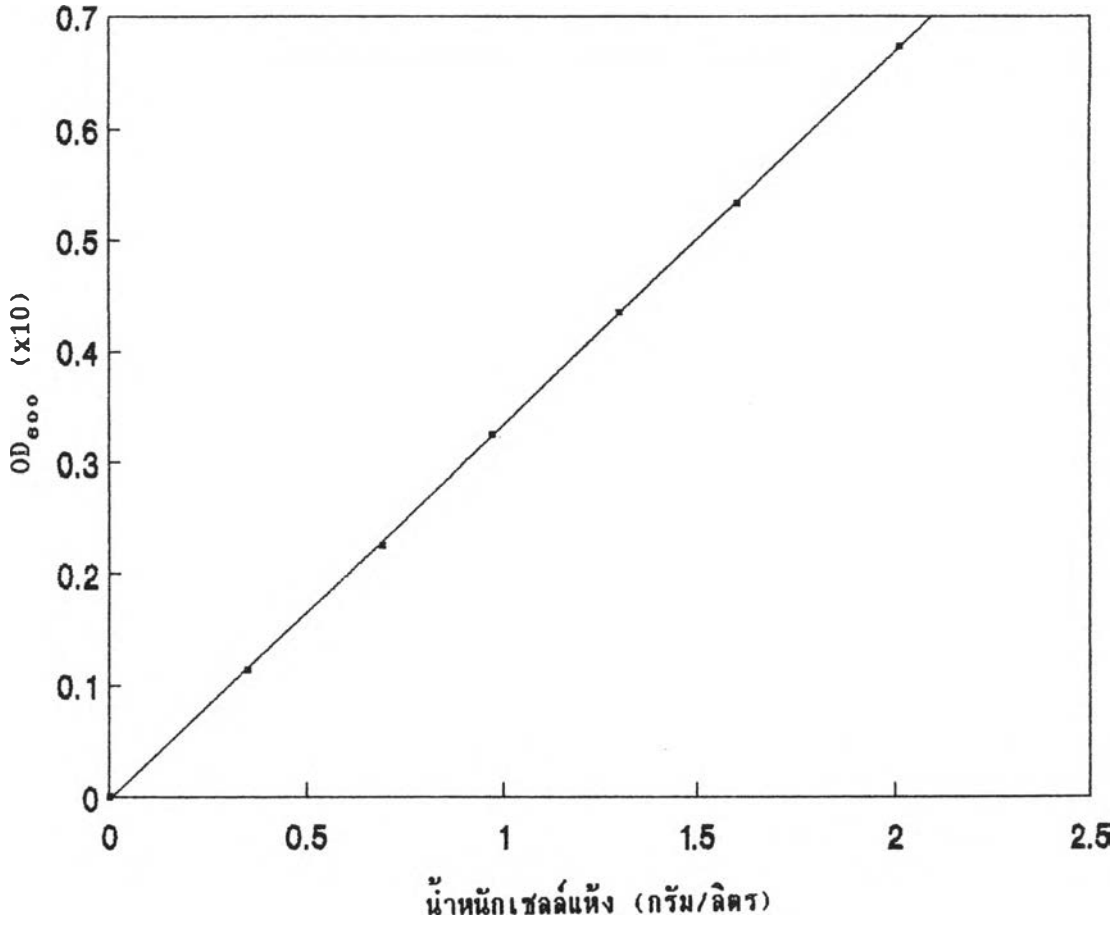
Ward, A.C., Rowley, B.I. and Dawes, E.A. Effect of oxygen and nitrogen limitation on poly-β-hydroxybutyrate biosynthesis in ammonium grown *Azotobacter beijerinckii*. J. Gen. Microbiol. 102(1977) : 61-68.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1ก. <u>วิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และกราฟมาตราฐานระหว่าง น้ำหนักเซลล์แห้งและ OD_{600} และวิธีหาอัตราการเจริญจำเพาะ</u>

เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ใช้สำหรับกระตุ้นการสร้าง PHB เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดวงปริมาตรเรียงตามลำดับ 20 40 60 80 100 และ 120 มล. เติมน้ำกลั่นให้แต่ละตัวอย่างมีปริมาตรเป็น 120 มล. เมื่อผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน นำแต่ละตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ค่า OD_{600} กระจายอยู่ในช่วง 0.1-0.7 บันทึกค่าไว้ ปริมาณที่เหลือของแต่ละตัวอย่างนำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบ ต่อนาที นาน 15 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ทั้ง 6 ตัวอย่าง ไปอบที่ 80°ซ จนได้น้ำหนักคงที่ แล้วนำค่า OD_{600} และค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร) ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์และคำนวนหาค่าความชัน (slope)

การหาอัตราการเจริญจำเพาะหาได้โดยนำค่า ln ของน้ำหนักเซลล์แห้งหรือ ln ของค่า OD_{600} ของแต่ละช่วงเวลามา plot คู่กับเวลา (ชั่วโมง) จากนั้นหาค่าความชันในช่วงที่มีความชันมากที่สุด (ใน *Alcaligenes* sp. A-04 ระยะเวลาที่มีความชันมากที่สุดประมาณ 0-12 ชั่วโมง) ค่าความชันนี้คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)



ภาคผนวกที่ 1ข. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Alcaligenes* sp. A-04 (ความชันเท่ากับ 3.33)

ภาคผนวกที่ 2 วิธีเตรียมสารละลายไดไนโตรซาลิไซลิกรีเอเจนต์

เตรียมโดยละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาณ 20 มล. เติมโซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตรท 30 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ผสมให้เข้ากัน บรรจุในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวกที่ 3 วิธีเตรียมสารละลาย LowryC และ LowryD

สารละลาย LowryC ได้จากการผสมสารละลาย LowryA และ LowryB ในอัตราส่วน 50 : 1 ซึ่งสารละลาย LowryA ประกอบด้วย โซเดียมคาร์บอเนต 20 กรัม โซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม โซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตท 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร สารละลาย LowryB ประกอบด้วย คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล.

สารละลาย LowryD ประกอบด้วย ฟีนอลรีเอเจนท์ และ น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1 โดยเตรียมทันทีที่จะใช้

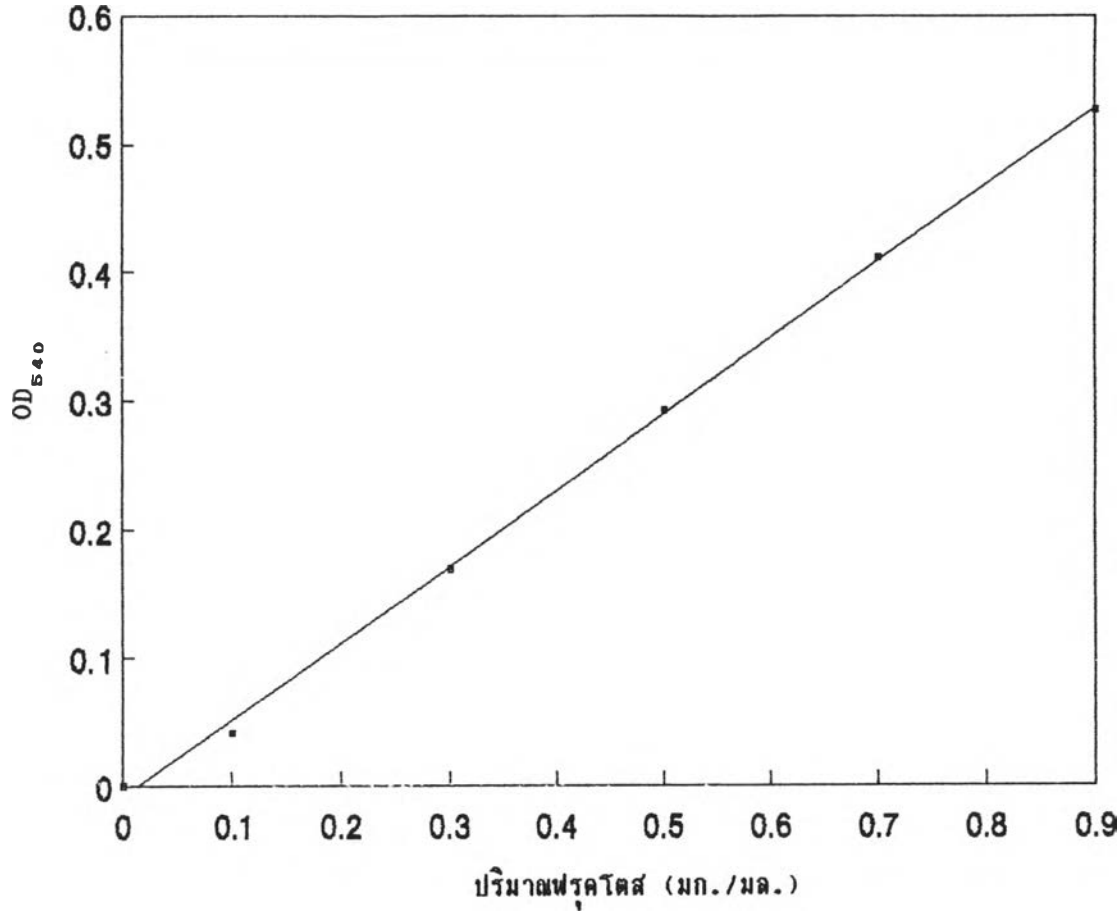
ภาคผนวกที่ 4 วิธีเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียม

โปแตสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ได้จากละลาย โปแตสเซียมคลอไรด์ 150 กรัมในน้ำปลอดประจุ 800 มล. แล้วเจือจางให้ได้ 1,000 มล.

ฟีนอลไนโตรพัสซายด์รีเอเจนต์ ได้จากละลาย ฟีนอล 7 กรัม และโซเดียมไนโตรพัสซายด์ 34 มก. ในน้ำปลอดประจุ 80 มล. เจือจางให้ได้ 100 มล. เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°ซ

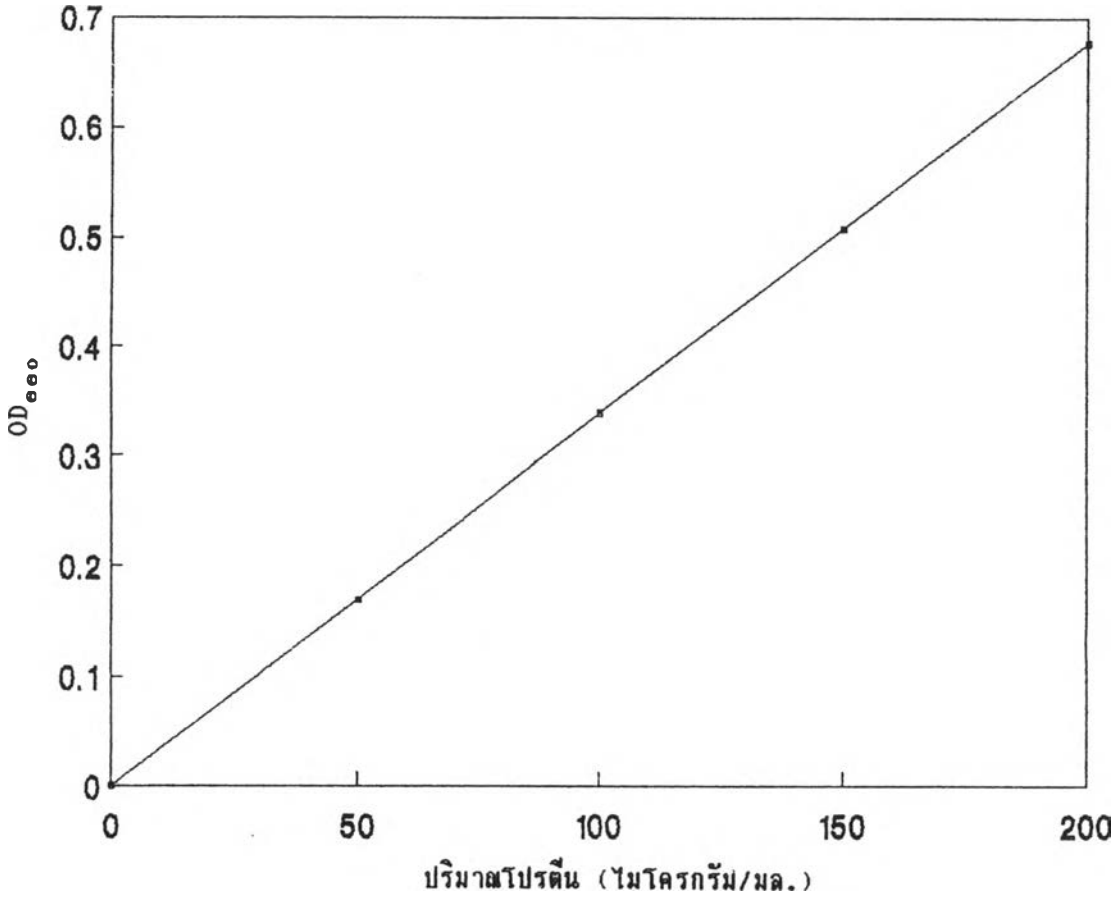
บัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรท์รีเอเจนท์ ได้จากละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.480 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 70 มล. เติมไดโซเดียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต 4.98 กรัม และเติมโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (5-5.25%) จำนวน 20 มล. ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 11.4-12.2 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วเจือจางให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มล.

สารละลาย EDTA เตรียมได้จากละลาย EDTA ไดโซเดียมซอลท์ (EDTA disodium) จำนวน 6 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 80 มล. ปรับ pH ให้ได้ 7.0 และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 มล.



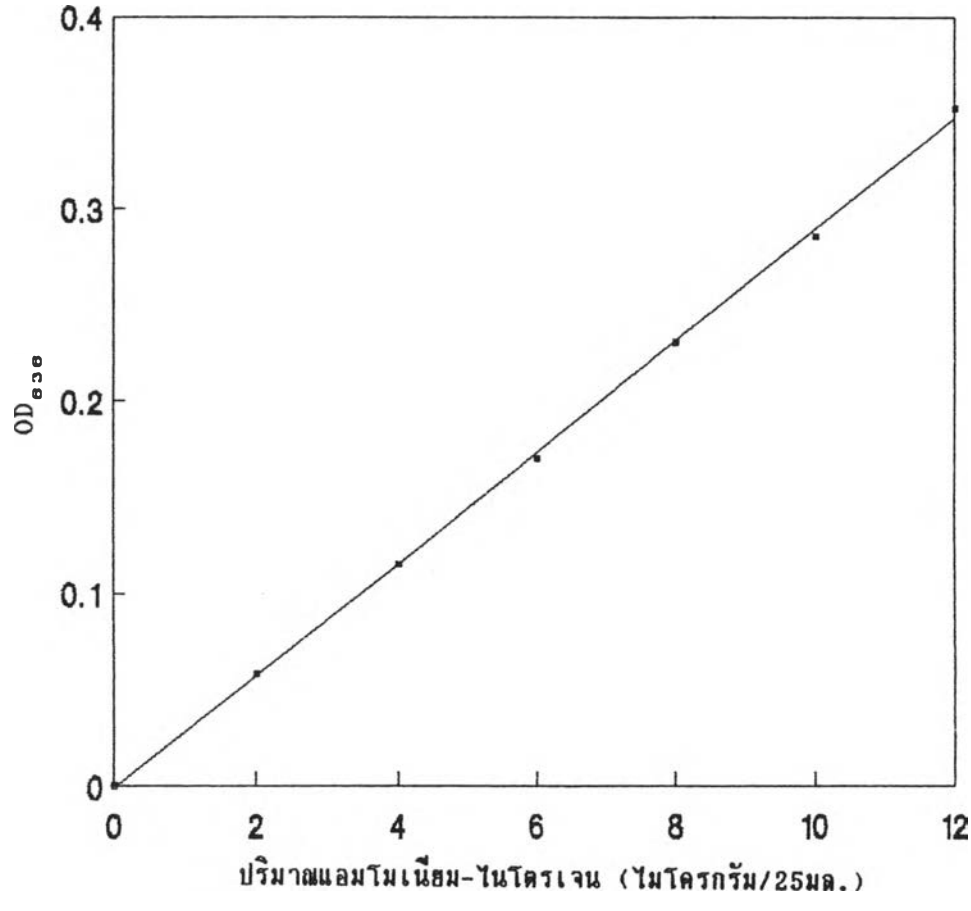
ภาคผนวกที่ 5 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณฟรุคโตส

(ความชันเท่ากับ 0.575)



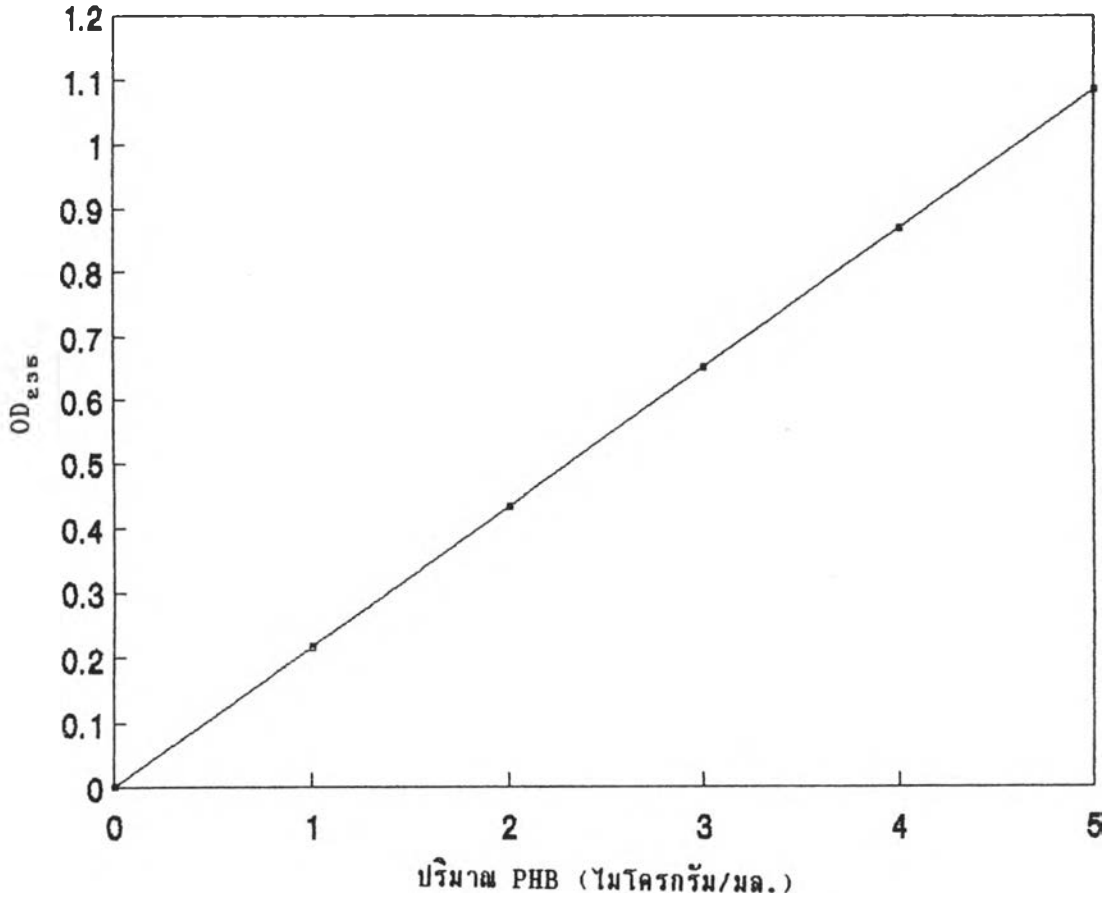
ภาคผนวกที่ 6 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีน

(ความชันเท่ากับ 3.385×10^{-3})



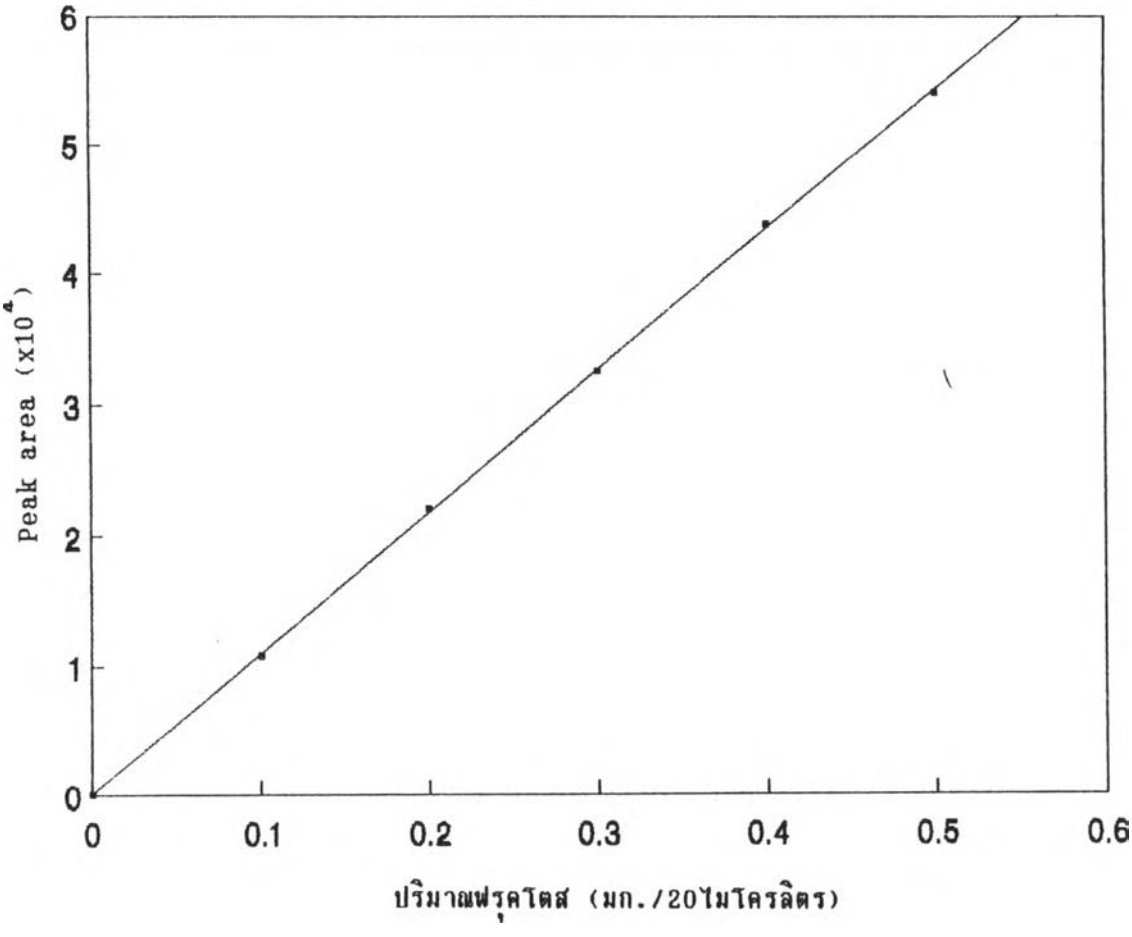
ภาคผนวกที่ 7 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจน

(ความชันเท่ากับ 0.028)

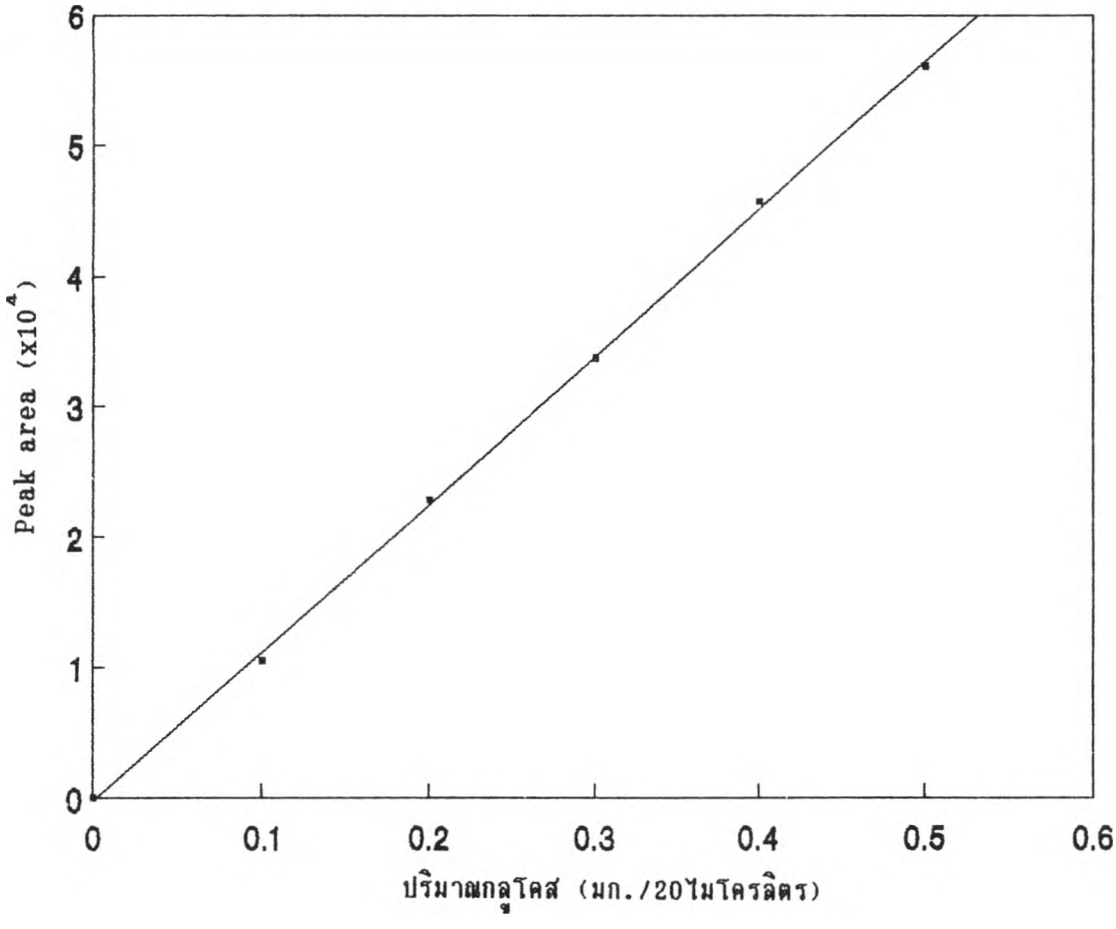


ภาคผนวกที่ 8 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ PHB

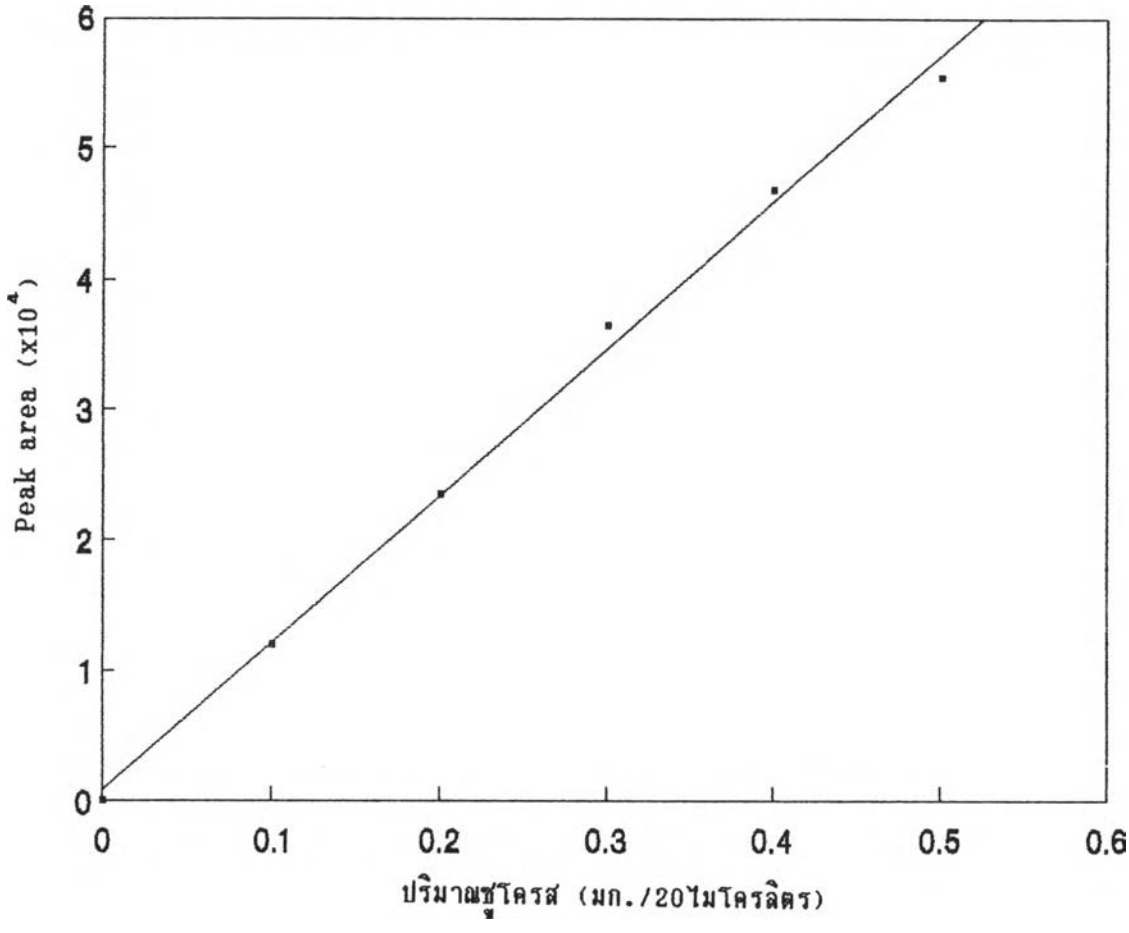
(ความชันเท่ากับ 0.217)



ภาคผนวกที่ 9ก. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณฟรุคโตสที่วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC (ความชันเท่ากับ 10.8×10^4)

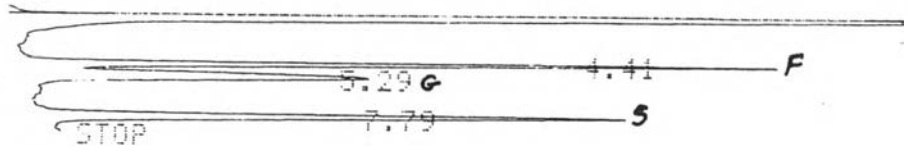


ภาคผนวกที่ 9ข. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณกลูโคสที่วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC (ความชันเท่ากับ 11.2×10^4)



ภาคผนวกที่ 9ค. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณซูโครสที่วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC (ความชันเท่ากับ 11.43 x 10^4)

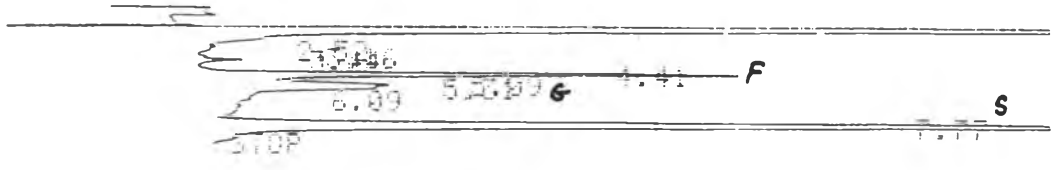
START 31.08.09.44.
STP TM 9



C-R1A
SMPL # 00
FILE # 3
REPT # 3805
METHOD 41

#	NAME	TIME		CONC	MK	AREA
0		4.41	F	33.4975		12035
0		5.29	G	32.0194	V	11504
0		7.79	S	34.483		12389
	TOTAL			99.9999		35928

ก.



C-R1A
SMPL # 00
FILE # 3
REPT # 3806
METHOD 41

#	NAME	TIME		CONC	MK	AREA
0		2.52		0.3772		178
0		3.16		0.2277		107
0		3.44		1.0905	V	514
0		4.41	F	19.3755		9148
0		5.09		7.9601	V	3758
0		5.31	G	6.7926	V	3207
0		6.09		0.6729	V	317
0		7.77	S	63.5032		29983
	TOTAL			99.9999		47214

ข.

ภาคผนวกที่ 10 โครมาโตแกรมของน้ำตาลฟรุคโตส กลูโคส และซูโครส มาตรฐาน (ก.) และ โครมาโตแกรมของน้ำตาลฟรุคโตส กลูโคส และซูโครส จากกากน้ำตาล (ข.)

F หมายถึง ฟรุคโตส G หมายถึง กลูโคส S หมายถึง ซูโครส

ประวัติผู้เขียน

นาย ชนัญ ผลประไพ เกิดวันที่ 15 ตุลาคม พ.ศ. 2512 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2533 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2534 ระหว่างการศึกษาได้มีโอกาสร่วมแสดงผลงานวิจัยภาคโปสเตอร์ ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 19 ระหว่างวันที่ 27-29 ตุลาคม 2536 ณ โรงแรมดุสิต เจ.บี. หาดใหญ่ สงขลา และได้เสนอผลงานวิจัยภาคบรรยาย ในการประชุมครั้งที่ 5 ของสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย ในหัวข้อเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อพัฒนาคุณภาพชีวิต ระหว่างวันที่ 25-27 พฤศจิกายน 2536 ณ โรงแรมฮิลตันอินเตอร์เนชั่นแนล กรุงเทพ