

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

ส่วนประกอบของสูตรอาหารที่ใช้กากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซต

กากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซต	20 กรัมต่อลิตร
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.4 กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1.5 กรัมต่อลิตร
Na_2HPO_4	1.8 กรัมต่อลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 กรัมต่อลิตร
Trace element solution	1.0 มิลลิลิตรต่อลิตร

ละลายส่วนผสมแต่ละชนิดให้ละลายจนหมดในน้ำกลั่น นำมาผสมกันเป็นเนื้อเดียว (ยกเว้นกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซตบรรจุในขวดแก้วก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ) นำส่วนผสมทั้งหมดไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเย็นจึงเติมกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซตที่เตรียมไว้

ส่วนประกอบของ Trace element

Ammonium Fe (III) citrate	6 มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 มิลลิกรัมต่อลิตร
H_3BO_3	0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมกันเป็นเนื้อเดียวในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แช่เย็นจนกว่าจะใช้ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ

หมายเหตุ บางการทดลองใช้อัตราส่วนของกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซต โดยคิดเป็นร้อยละของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในแต่ละชุดการทดลอง

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารและการวิเคราะห์

การเตรียมสารและการวิเคราะห์

1. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีดีเอ็นเอส (DNS method)

ชั่ง DNS (3,5 dinitrosalicylid acid) 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายค่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัมในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) ที่เล็กน้อย คนให้เข้ากัน นำไปอุ่นในน้ำร้อนจนสารละลายใส เติมโพแทสเซียมทาทเรต 300 กรัม ตามลำดับ ทำให้เย็นแล้วปรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้องทิ้งไว้ค้างคืน ก่อนนำมาใช้งาน

การสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาล

สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ชั่งกลูโคส 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ได้สารละลาย กลูโคสเข้มข้น 1 มก/มล

วิธีการทำกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

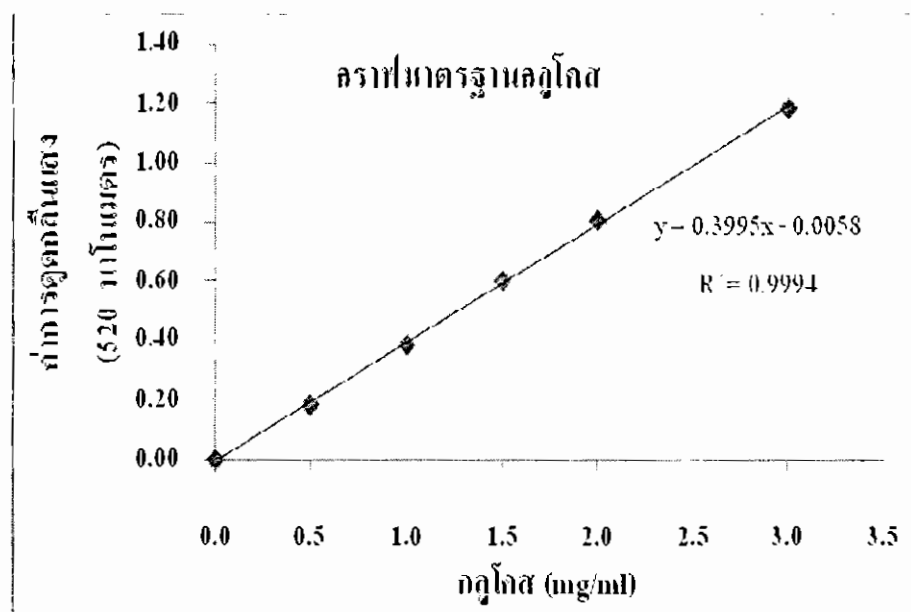
เจือจางสารละลายกลูโคสให้ได้ความเข้มข้น ดังแสดงในตารางภาคผนวก-1

หลอดที่	สารละลายกลูโคส 1 mg/ml	Acetate buffer (ml)	สารละลายกลูโคส มาตรฐาน
1	0.0	500	0
2	0.5	475	25
3	1.0	450	50
4	1.5	425	75
5	2.0	400	100
6	3.0	350	150

นำหลอดทดลองทั้ง 6 หลอดตามปริมาตรข้างต้น เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำเย็น 5 นาที เติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ความเข้มข้นของน้ำตาลกับค่าการดูดกลืนแสง โดยคำนวณหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจาก

$$\text{ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (มก/มล)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟกลูโคสมาตรฐาน}}$$



ภาพภาคผนวก ข-1 กราฟมาตรฐานกลูโคสสำหรับหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

2. การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (dry cell weight, DCW)

ใส่ตัวอย่างน้ำหนักร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 1 มิลลิลิตร ที่ผ่านการอบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้ว พร้อมทั้งนำไปปั่นเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใส (supernatant) ทิ้ง จากนั้นนำตะกอนเซลล์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

$$\text{น้ำหนักเซลล์ (มก/มล)} = (\text{เซลล์+น้ำหนักหลอด}) - \text{น้ำหนักหลอด}$$

3.การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน

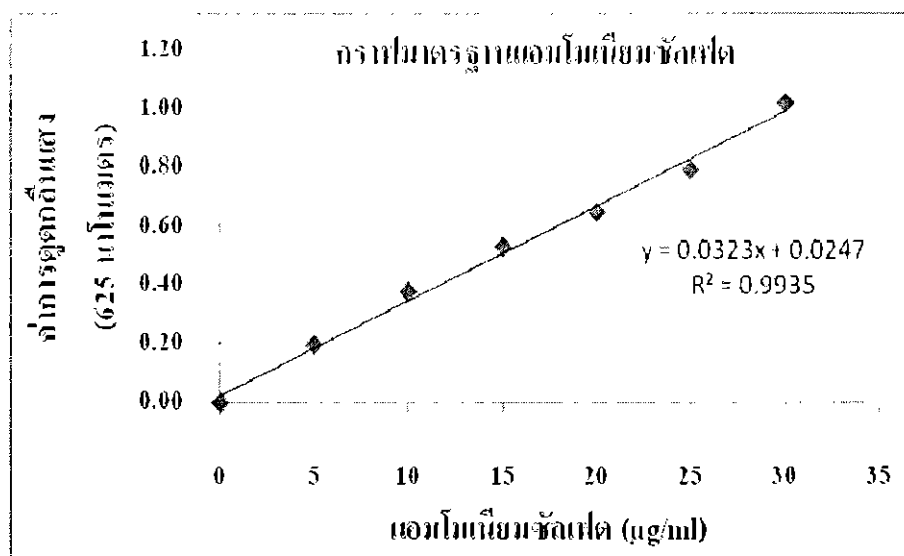
วิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตโดยวิธี Phenol-hypochlorite (Weatherburn, 1967) สารเคมี มีดังนี้

1. สารละลาย A เตรียมโดยละลายฟีนอล 5 กรัม และโซเดียมไนโตรปริสไซด์ 25 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร
2. สารละลาย B เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2.5 กรัม และโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 4.2 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. ใส่สารละลาย A มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดกลาง
2. เติมห่วงอย่างที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม (ปริมาณแอมโมเนียม 5-50 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร) 1 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกพลาสติก เขย่าให้เข้ากัน
3. เติมสารละลาย B 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นสารมาตรฐาน ดังแสดงในภาพภาคผนวก ข-2

$$\text{แอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง} \times \text{อัตรากราฟเชิงอาจ}}{\text{ความชัน} \times 1,000}$$



ภาพภาคผนวก ข-2 กราฟมาตรฐานแอมโมเนียมซัลเฟตสำหรับหาปริมาณไนโตรเจน

3.การวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต การวิเคราะห์ด้วยวิธี Gravimetric method

นำตัวอย่างน้ำหนักปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่อบฆ่ากัมและรู้ค่าน้ำหนักหลอดเปล่า จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงในอัตราเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร พร้อมทั้งผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มในอ่างควบคุมความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงในอัตราเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นใส่สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ (ทางการค้าที่มีส่วนผสมของคลอรีนร้อยละ 6) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อล้างส่วนของตะกอนที่ได้ และนำไปปั่นเหวี่ยงในอัตราเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1.2 มิลลิลิตรอีกครั้ง โดยนำไปปั่นเหวี่ยงในอัตราเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง และนำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำมาชั่งน้ำหนัก โดยนำน้ำหนักของหลอดที่มีส่วนตะกอนอยู่มาชั่งด้วยน้ำหนักของหลอดเปล่า ซึ่งจะได้เป็นค่าน้ำหนักที่แท้จริงของปริมาณพลาสติกที่เชื้อแบคทีเรียผลิตได้

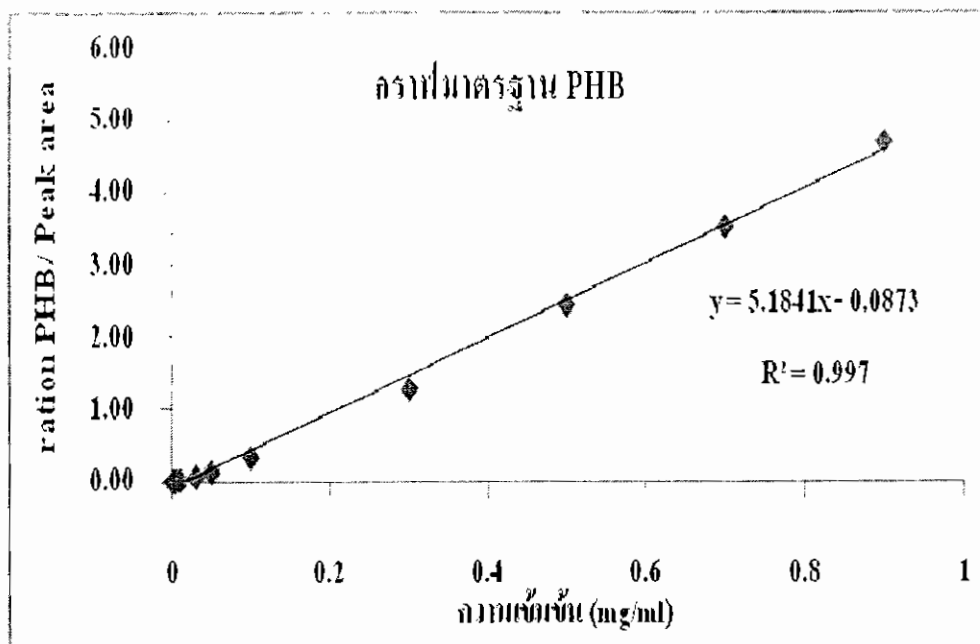
ปริมาณ PHB (มก/มล) = (PHB+น้ำหนักหลอด) - น้ำหนักหลอด

$$\text{ร้อยละการสะสม PHB (\% PHB)} = \frac{\text{ปริมาณ PHB}}{\text{ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง}} \times 100$$

4.การวิเคราะห์ปริมาณ PHB โดยใช้เครื่อง Gas chromatography-mass spectrophotometry

การเตรียมสารมาตรฐาน Poly [(R)-3-hydroxybutyric acid], natural origin จาก Aldrich Product number 363502 ดังนี้

1. ชั่งสารมาตรฐาน PHB 10 มิลลิกรัม จากนั้นเติม 1 มิลลิลิตรละลายในคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนสารละลายหมด
2. ทิ้งให้สารละลายเย็น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยคลอโรฟอร์ม จะได้ สารละลายมาตรฐาน PHB เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร
3. ดูดสารละลายมาตรฐาน PHB ปริมาตร 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09 และ 1.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีฝาปิด ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 มิลลิลิตรด้วยคลอโรฟอร์ม
4. เติมสาร esterification fluid 1 มิลลิลิตร (เบนโซอิก แอซิด 0.5 กรัม เมทานอล 242 มิลลิลิตร และ ซัลฟูริก 8 มิลลิลิตร)
5. นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง
6. ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นใส่น้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร พร้อมทั้ง ผสมให้เข้ากัน
7. เก็บสารชั้นของสารเอควียส (aqueous phase) ซึ่งเป็นส่วนของคลอโรฟอร์มที่มี β -hydroxymethyl ester ละลายอยู่
8. วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS



ภาพภาคผนวก ข-3กราฟมาตรฐานจากสารมาตรฐาน PHB จาก Aldrich

วิธีการคำนวณ

$$\text{ความเข้มข้น PHB} = \frac{\text{สัดส่วนพื้นที่ของสารมาตรฐาน (peak area of standard)}}{\text{สัดส่วนพื้นที่ของสาร internal standard (peak area of internal standard)}} \quad (\text{mg/ml})$$

5. การเตรียมสารละลาย sodium dodecyl sulfate (SDS)

ชั่ง SDS น้ำหนัก 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตรคนให้เข้ากันจนสารละลายใส จะได้ SDS ความเข้มข้นร้อยละ 1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้

ค่าการเจริญ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PIIB

การศึกษาที่ 1

ตารางภาคผนวก ค-1 ค่าความขุ่นในการหาการเจริญเบื้องต้นของ *A. lactus* TISTR 1403 ที่เลี้ยง
ใน อาหารเหลวสูตร Nutrient broth

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0	0.011	0.00
2	0.072	0.01
3	0.189	0.00
6	0.886	0.01
9	1.055	0.00
12	1.400	0.01
15	1.486	0.09
18	1.500	0.02
21	1.558	0.01
24	1.420	0.02
27	1.034	0.02
39	0.830	0.00
42	0.726	0.01
54	0.980	0.01
81	0.554	0.05

ตารางภาคผนวก ค-2 ค่าการเจริญ ^u น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB ของ *A. lactus* TISTR 1403, *A. lactus* TISTR 1403/2aa, *A. lactus* TISTR 1403/γ และ *A. lactus* TISTR 1403/γ-2AA A ที่เลี้ยงในอาหารอาหารตัดแปลงสูตรสำหรับผลิต PHB คัดแปลงจาก Grothe et al., (1999)

เวลา (ชั่วโมง)	<i>A. lactus</i> TISTR 1403				<i>A. lactus</i> TISTR 1403/2aa				<i>A. lactus</i> TISTR 1403/γ				<i>A. lactus</i> TISTR 1403/γ-2AA			
	OD 600 nm	น้ำหนัก เซลล์แห้ง (g/l)	ปริมาณ PHB (g/l)	OD 600 nm	น้ำหนัก เซลล์แห้ง (g/l)	ปริมาณ PHB (g/l)	OD 600 nm	น้ำหนัก เซลล์แห้ง (g/l)	OD 600 nm	น้ำหนัก เซลล์แห้ง (g/l)	ปริมาณ PHB (g/l)	OD 600 nm	น้ำหนัก เซลล์แห้ง (g/l)	OD 600 nm	น้ำหนัก เซลล์แห้ง (g/l)	ปริมาณ PHB (g/l)
0	0.01	1.00	0.00	0.10	0.60	0.00	0.02	2.00	0.02	2.00	0.10	0.06	0.63	0.10	0.63	0.10
12	0.02	1.95	0.45	0.37	1.05	0.47	1.66	2.37	1.66	2.37	0.10	0.29	1.17	0.20	1.17	0.20
24	0.02	2.25	0.55	1.36	1.17	0.40	2.14	3.65	2.14	3.65	0.20	1.49	1.20	0.30	1.20	0.30
36	0.03	2.75	0.65	3.13	1.50	0.20	2.08	2.77	2.08	2.77	0.70	2.15	1.20	0.20	1.20	0.20
48	0.37	2.50	0.95	3.10	1.45	0.33	1.85	2.70	1.85	2.70	0.47	2.55	1.50	0.60	1.50	0.60
60	0.36	3.10	0.47	2.58	1.10	0.40	1.56	3.50	1.56	3.50	0.40	2.81	1.55	0.60	1.55	0.60
72	0.45	2.60	0.40	2.61	0.95	0.45	1.86	4.13	1.86	4.13	0.47	2.86	1.95	0.50	1.95	0.50
84	0.43	2.15	0.50	2.75	1.35	0.13	1.91	3.63	1.91	3.63	0.40	2.75	1.35	0.80	1.35	0.80

การศึกษาที่ 2 ผลของการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

ตารางภาคผนวก ค-3 การเจริญของ *A. laevis* TISTR 1403/Y-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)							
	ชุดควบคุม (กลูโคส)	ฟรุคโตส	ซูโครส (Lab garde)	น้ำตาล ทรายขาว มิตรผล	น้ำตาลทราย แดงมิตรผล	น้ำตาลแร่ ธรรมชาติ มิตรผล	มอนโทเต็กซ์ ทรินทาง การค้า	ไฮโดรไลเซท ของแป้งมัน สำปะหลัง
0	0.02	0.05	0.02	0.04	0.06	0.03	0.21	0.10
12	1.66	0.07	1.11	1.40	0.73	1.76	0.42	0.22
24	2.14	3.03	4.51	4.52	5.00	4.71	1.31	1.40
36	2.08	4.75	4.57	4.56	5.07	4.60	3.38	4.41
48	1.85	4.71	4.52	4.48	5.10	4.53	3.42	6.56
60	1.56	4.47	4.51	4.23	4.92	4.24	3.47	6.00

ตารางภาคผนวก ก-4 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. lacus* TISTR 14037/-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้หลังการบ่มชนิดต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)							
	หุตุควบคุม (กลูโคส)	ฟรุคโตส	ซูโครส (Lab garde)	น้ำตาล ทรายขาว มิตรผล	น้ำตาลทราย แดงมิตรผล	น้ำตาลแร่ ธรรมชาติมิตร ผล	นอนโทเต็กซ์ ทรินทาง การค้า	ไฮโดรไลเซท ของแป้งมัน สำปะหลัง
0	0.60	2.68	1.87	2.89	2.64	1.16	3.17	2.52
12	1.18	2.28	2.78	2.55	2.74	2.97	3.42	2.68
24	1.83	3.51	3.30	3.47	4.48	3.33	4.43	4.78
36	1.38	3.21	2.82	3.77	3.26	3.92	4.53	4.83
48	1.35	4.28	3.26	3.42	3.22	4.70	4.42	4.17
60	1.75	3.37	2.93	4.69	3.47	3.96	6.43	3.86
								1.29

ตารางภาคผนวก ก-5 ปริมาณ PHB ของ *A. lacus* TISTR 14037-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร)							
	หูดควบคุม (กลูโคส)	ฟรุคโตส	ซูโครส (Lab garde)	น้ำตาล ทรายขาว มิตรผล	น้ำตาลทราย แดงมิตรผล	น้ำตาลแร่ ธรรมชาติ มิตรผล	มอนิโทเกกซ์ ทรินทาง การค้า	ไฮโดรไลเซท ของแป้งมัน สำปะหลัง
0	0.00	0.93	1.27	0.90	0.67	1.38	0.10	2.15
12	0.10	0.82	1.90	1.13	0.77	1.98	0.10	2.05
24	0.20	0.83	1.88	1.37	1.33	2.77	0.09	2.35
36	0.70	1.30	2.40	1.30	1.20	2.18	0.31	2.53
48	0.47	1.72	2.63	1.85	1.22	2.20	0.34	2.05
60	0.40	1.57	1.60	2.17	1.15	2.00	0.30	2.80
								ไฮโดรไลเซท ของกากมัน สำปะหลัง

ตารางภาคผนวก ค-6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คิงเหลือ *A. laccus* TISTR 1403/γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คิงเหลือ (กรัมต่อลิตร)							
	ชุดควบคุม (กลูโคส)	ฟรุคโตส	ซูโครส (Lab garde)	น้ำตาล ทรายขาว มีตรผล	น้ำตาลทราย แดงมีตรผล	น้ำตาลแร่ ธรรมชาติ มีตรผล	มอนโทเดคซ์ พรีนทาง การค้า	ไฮโดรไลเซท ของแป้งมัน สำปะหลัง
0	32.53	21.91	19.97	20.31	21.66	19.39	20.97	27.52
12	30.63	21.60	19.27	14.12	9.77	18.72	19.87	16.32
24	28.13	17.39	15.10	13.13	5.93	16.08	16.10	13.90
36	28.16	11.25	14.24	13.07	4.82	14.73	15.24	10.02
48	27.60	10.52	14.61	11.54	4.62	13.81	14.61	9.93
60	27.53	10.47	14.24	10.60	4.13	12.70	14.24	8.10

การศึกษาที่ 3 ความเข้มข้นไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน
 ตารางภาคผนวก ค-7 การเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้
 ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)					
	ความเข้มข้นไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลัง (ร้อยละ)					
	ชุดควบคุม	30	40	50	60	70
0	0.01	0.10	0.13	0.15	0.16	0.17
12	0.01	0.22	0.30	0.32	0.40	0.37
24	0.03	1.40	1.45	1.40	1.39	1.14
36	0.87	4.41	5.23	4.68	3.57	2.71
48	3.88	6.56	5.32	4.11	3.16	2.93
60	3.58	6.00	4.24	3.64	3.30	2.78

ตารางภาคผนวก ค-8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงใน
 อาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือ (กรัมต่อลิตร)					
	ความเข้มข้นไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลัง (ร้อยละ)					
	ชุดควบคุม	30	40	50	60	70
0	20.85	24.80	26.36	33.58	38.75	41.40
12	20.74	24.50	26.32	33.28	37.06	40.67
24	18.03	13.90	18.90	23.26	30.99	38.20
36	18.05	10.02	18.14	23.50	30.75	35.01
48	17.69	9.93	14.11	19.20	24.99	30.27
60	17.65	8.10	13.61	19.54	27.23	32.89

ตารางภาคผนวก ก-9 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซตของกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ถ้าน้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)					
	ความเข้มข้นไฮโดรไลเซตของกากมันสำปะหลัง (ร้อยละ)					
	ชุดควบคุม	30	40	50	60	70
0	1.28	0.55	0.90	0.66	0.28	0.70
12	1.31	0.68	1.11	1.14	1.21	1.74
24	1.48	1.11	1.50	1.66	1.49	2.00
36	3.98	1.25	1.61	1.41	1.43	1.46
48	2.83	2.08	1.04	1.07	1.56	1.31
60	2.29	1.29	1.05	1.17	1.16	1.56

ตารางภาคผนวก ก-10 ปริมาณ PHB ของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซตของกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร)					
	ความเข้มข้นไฮโดรไลเซตของกากมันสำปะหลัง (ร้อยละ)					
	ชุดควบคุม	30	40	50	60	70
0	0.45	0.30	0.24	0.22	0.09	0.18
12	0.54	0.44	0.31	1.08	0.40	0.28
24	0.30	0.52	0.33	1.02	0.31	0.28
36	0.57	0.72	0.64	0.73	0.71	0.27
48	0.34	0.58	0.50	0.49	0.52	0.61
60	0.62	0.58	0.44	0.62	0.53	0.42

การศึกษาที่ 4 แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์
 ตารางภาคผนวก ค-11 การเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่ง
 ไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)					
	แหล่งไนโตรเจน					
	ชุด ควบคุม	แอมโมเนียม ไนเตรท	แอมโมเนียม คลอไรด์	ยูเรีย	แอมโมเนียม อะซิเตรต	แอมโมเนียม ซัลเฟต
0	0.03	0.22	0.19	0.14	0.18	0.17
12	0.13	0.75	1.04	0.64	0.81	0.83
24	0.99	5.18	5.44	3.87	4.83	4.71
36	1.09	4.88	7.81	4.59	5.76	6.05
48	2.34	9.11	6.81	4.58	5.69	6.25
60	3.27	9.85	6.37	8.11	8.11	7.24

ตารางภาคผนวก ก-12 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)					
	แหล่งไนโตรเจน					
	ชุดควบคุม	แอมโมเนียมไนเตรท	แอมโมเนียมคลอไรด์	ยูเรีย	แอมโมเนียมอะซิเตรต	แอมโมเนียมซัลเฟต
0	29.84	34.71	38.36	38.75	35.68	33.09
12	27.36	19.68	37.63	37.06	27.74	33.58
24	25.81	15.92	36.03	30.99	18.90	23.26
36	25.83	11.48	35.01	30.75	18.14	23.50
48	25.32	11.37	31.64	26.76	14.11	19.20
60	25.26	9.27	32.89	27.23	13.61	19.54

ตารางภาคผนวก ก-13 ปริมาณไนโตรเจนของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)				
	แหล่งไนโตรเจน				
	แอมโมเนียมไนเตรท	แอมโมเนียมคลอไรด์	ยูเรีย	แอมโมเนียมอะซิเตรต	แอมโมเนียมซัลเฟต
0	1.17	1.66	1.34	0.76	1.14
12	0.41	0.55	0.23	0.24	0.29
24	0.09	0.24	0.25	0.03	0.07
36	0.05	0.05	0.29	0.02	0.03
48	0.09	0.04	0.26	0.02	0.01
60	0.06	0.04	0.28	0.01	0.03

ตารางภาคผนวก ก-14 คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)					
	แหล่งไนโตรเจน					
	ชุด ควบคุม	แอมโมเนียม ไนเตรท	แอมโมเนียม คลอไรด์	ยูเรีย	แอมโมเนียม อะซิเตรต	แอมโมเนียม ซัลเฟต
0	0	0.12	0.14	0.11	0.48	0.00
12	0.95	1.45	0.85	0.79	1.25	0.47
24	0.64	1.80	1.11	0.76	2.14	1.84
36	0.72	1.70	5.37	0.78	1.91	1.67
48	0.43	6.60	2.84	0.80	1.62	1.78
60	0.41	5.25	2.21	1.17	2.18	2.55

ตารางภาคผนวก ก-15 ปริมาณ PHB ของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร)					
	แหล่งไนโตรเจน					
	ชุด ควบคุม	แอมโมเนียม ไนเตรท	แอมโมเนียม คลอไรด์	ยูเรีย	แอมโมเนียม อะซิเตรต	แอมโมเนียม ซัลเฟต
0	0	0.04	0.08	0.03	0.11	0.00
12	0.14	1.20	0.15	0.75	0.19	0.06
24	0.17	0.92	1.06	0.22	1.52	0.90
36	0.17	1.39	1.61	0.26	0.92	1.17
48	0.30	1.98	1.60	0.49	1.36	0.67
60	0.26	2.08	1.57	0.65	1.65	0.80

การศึกษาที่ 5 ศึกษาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) ที่เหมาะสม
 ตารางภาคผนวก ก-16 การเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้
 อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)					
	อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน					
	ชุดควบคุม	300	60	30	21.4	15
0	0.61	0.61	0.59	0.60	0.60	0.65
12	0.88	1.18	1.60	1.70	1.70	1.77
24	1.02	1.69	2.32	3.88	4.58	5.15
36	0.43	0.81	1.69	3.15	4.03	6.10
48	0.89	1.24	2.03	4.21	3.23	5.63
60	0.80	1.40	2.00	4.46	3.99	4.93

ตารางภาคผนวก ก-17 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์กึ่งเหลือของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงใน
 อาหารที่ใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์กึ่งเหลือ (กรัมต่อลิตร)					
	อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน					
	ชุดควบคุม	300	60	30	21.4	15
0	19.02	24.28	25.22	22.40	19.84	22.97
12	18.15	23.09	23.22	13.96	15.02	17.69
24	18.77	22.28	18.77	13.77	14.44	14.52
36	18.90	23.45	18.77	12.89	15.31	13.33
48	17.96	24.53	18.77	13.33	12.31	13.06
60	16.33	23.28	19.40	13.54	8.84	14.52

ตารางภาคผนวก ก-18 ปริมาณไนโตรเจนของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)					
	อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน					
	ชุดควบคุม	300	60	30	21.4	15
0	0.05	0.31	0.95	1.84	1.84	3.15
12	0.01	0.01	0.03	0.77	0.77	2.49
24	0.02	0.01	0.04	0.05	0.05	1.32
36	0.01	0.01	0.06	0.04	0.04	0.29
48	0.01	0.01	0.04	0.03	0.03	0.14
60	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.11

ตารางภาคผนวก ก-19 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)					
	อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน					
	ชุดควบคุม	300	60	30	21.4	15
0	1.58	1.59	1.29	1.23	1.05	1.20
12	2.03	2.43	2.01	2.10	2.23	2.32
24	2.27	3.21	4.08	3.47	3.08	2.50
36	1.57	3.37	3.37	3.41	3.24	4.44
48	2.18	3.20	3.06	3.26	3.27	4.38
60	1.80	3.27	3.11	3.50	3.09	4.23

ตารางภาคผนวก ก-20 ปริมาณ PHB ของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้
อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร)					
	อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน					
	ชุดควบคุม	300	60	30	21.4	15
0	0.12	0.80	0.58	0.80	0.52	0.23
12	0.13	1.10	1.12	1.02	1.07	1.33
24	0.13	1.90	2.22	2.00	1.95	1.98
36	0.40	1.62	1.80	1.92	1.93	2.60
48	0.48	1.72	1.82	1.77	1.70	2.32
60	0.34	1.70	1.60	1.70	1.57	2.05

การศึกษาที่ 6 ศึกษาผลของความเป็นกรดต่าง

ตารางภาคผนวก ก-21 การเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่าความ
เป็นกรดต่างแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)			
	ค่าความเป็นกรดต่าง			
	6	6.5	7	8
0	0.30	0.29	0.29	0.30
12	0.68	0.84	0.82	0.80
24	1.13	1.76	1.82	1.79
36	3.43	5.37	5.86	6.28
48	4.95	5.78	6.77	6.03
60	5.18	5.90	7.37	4.46

ตารางภาคผนวก ก-22 ค่าความเป็นกรดต่างของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดต่างแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรดต่าง			
	6	6.5	7	8
0	6	6.5	7	8
12	5.91	6.36	6.66	6.92
24	6.13	5.23	5.62	5.41
36	5.64	4.74	5.04	5.38
48	4.61	4.66	4.7	5.69
60	4.73	4.71	4.85	5.85

ตารางภาคผนวก ก-23 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดต่างแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือ (กรัมต่อลิตร)			
	ค่าความเป็นกรดต่าง			
	6	6.5	7	8
0	25.90	25.28	24.02	21.27
12	23.40	23.09	21.52	20.19
24	22.34	23.21	20.31	20.19
36	21.65	23.44	19.06	16.22
48	19.33	24.53	16.93	14.43
60	13.95	23.27	12.97	14.47

ตารางภาคผนวก ก-24 ปริมาณไนโตรเจนของ *A. lactus* FISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดต่างแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)			
	ค่าความเป็นกรดต่าง			
	6	6.5	7	8
0	3.35	3.58	3.53	3.47
12	3.50	3.48	3.55	3.20
24	3.45	2.60	1.84	1.97
36	2.56	1.38	1.44	0.34
48	1.76	1.09	0.34	0.25
60	1.64	1.14	0.38	0.24

ตารางภาคผนวก ก-25 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. lactus* FISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดต่างแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	ค่าความเป็นกรดต่าง			
	6	6.5	7	8
0	1.18	2.14	2.05	0.80
12	2.24	2.29	2.73	2.30
24	3.38	3.34	3.00	2.32
36	3.21	3.26	3.95	2.55
48	3.35	3.26	4.95	2.60
60	3.27	3.24	3.20	2.55

ตารางภาคผนวก ก-26 ปริมาณ PHB ของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่า
ความเป็นกรดต่างแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร)			
	ค่าความเป็นกรดต่าง			
	6	6.5	7	8
0	0.60	1.06	1.06	1.01
12	1.30	1.18	1.17	1.09
24	1.90	1.08	2.07	1.10
36	1.55	1.33	1.21	1.51
48	1.60	1.98	1.97	1.06
60	1.55	1.54	1.53	1.06

การศึกษที่ 7 ศึกษาการผลิตพลาสติกชีวภาพในระดับถึงปฏิกิริยชีวภาพ
 ตารางภาคผนวก ค-27 ค่าการเจริญ ค่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณออกซิเจน ปริมาณน้ำตาสีตัว ปริมาณไนโตรเจน คำนำนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB ของ *A. laccus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 nm)	ค่าความ เป็นกรดต่าง	ปริมาณออกซิเจนละลายในถังหมัก (ร้อยละโมลต่อโมล)	ปริมาณน้ำตาล รีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	คำนำนักเซลล์ แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร)
0	0.00	7.03	142.00	31.54	3.46	0.93	0.09
2	0.56	7.03	142.00	27.29	3.19	1.53	0.20
4	0.55	7.04	141.80	26.22	3.48	1.10	0.50
6	0.60	7.04	141.80	26.91	3.46	1.93	0.69
10	0.89	7.02	132.90	26.53	3.49	2.87	0.85
12	1.11	7.04	121.00	26.03	3.39	3.22	0.83
18	2.36	7.26	93.10	21.94	2.96	4.40	2.43
24	3.10	6.96	106.50	20.19	2.81	4.53	2.47
30	5.77	6.20	3.40	18.27	1.38	4.67	2.41
36	6.41	7.14	9.10	11.68	0.06	4.78	2.41
42	6.68	7.25	75.00	11.26	0.04	4.88	2.41
48	6.51	6.98	82.30	10.85	0.03	4.20	2.47
54	6.55	6.98	107.50	10.56	0.03	4.24	1.81
60	6.55	7.03	120.20	6.13	0.03	4.29	1.59
72	6.51	7.13	142.00	6.57	0.04	4.29	1.55