บทที่ 4

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

4.1 อุปกรณ์

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ของบริษัท Gesells chaft fur Labortechnik, Germany.

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Kubota 5100 ของบริษัท KUBOTA corporation, Japan.

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20D ของบริษัท Milton roy company, USA.

เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Digital pH/Temperature meter) รุ่น 671 ของบริษัท JENCO Electronics, Ltd, Taiwan.

ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น VS-124 ของบริษัท ISSCO, USA.

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HL24ADY ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan.

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น julabo ของบริษัท labartechnik GMBH, Germany

ถังหมัก (fermenter) รุ่น MINI-JAR-FERMENTOR KMJ ของบริษัท Mituwa, Japan.

ระบบไมโครฟิลเตรชัน พร้อมถังหมักประกอบด้วย ถังหมักแก้ว 1 ลิตร รุ่น MINI-JAR-FERMENTOR KMJ ของบริษัท Mituwa, Japan. ตัวกรองเซรามิก รุ่น 1M-1 ของบริษัท Toshiba ceramic Co., Ltd. Japan. ระบบการวัดและควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

and controller) ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland. ปั๊มสารอาหาร (feed pump) รุ่น MasterFlex 7518-10 ของบริษัท Cole Parmer Instrument Co.,Illinois. ควบคุมอุณหภูมิด้วยระบบคอยล์หล่อภายนอก ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ รุ่น julabo ของบริษัท labartechnik GMBH, Germany. ควบคุมระดับโดยใช้ลูกลอย ของบริษัท Technic Pool, Thailand. ระบบให้อากาศด้วยเครื่องอัดอากาศ (air compressor) รุ่น 0.2 OP-5S ของบริษัท Hitachi,Ltd.Japan.

เครื่องอุลตราโซนิค (ultrasonic bath) รุ่น Bransonic 2200 ของบริษัท Branson Ultrasonics Corporation, USA.

เครื่อง HPLC ประกอบด้วย คอลัมน์ชนิด μ Bondapax C_{18}, 996 Photodiode Array Detector และเครื่องฉีดตัวอย่างรุ่น 717 Autosampler ของบริษัท Water, USA.

4.2 <u>สารเคมี</u>

ฟรุกโตส ของบริษัท MERCK, Germany.

สารสกัดจากยีสต์ ของบริษัท GIBCO BRL, Scotland.

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ของบริษัท AJAX CHEMICALS, Australia.

โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท MERCK, Germany.

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ของบริษัท CARLOERBA, Italy.

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท FLUKA,Switzreland.

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ของบริษัท MERCK, Germany.

ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$) ของบริษัท AJAX CHEMICALS, Australia.

เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ของบริษัท AJAX CHEMICALS, Australia.

แอมโมเนียมโมลิบเดต ของบริษัท AJAX CHEMICALS, Australia.

บอริคแอซิด (H_3BO_3) ของบริษัท MERCK, Germany.

ฟีนอล (phenol) ของบริษัท CARLOERBA, Italy.

โซเดียมไนโตรพรัสไซด์ (sodium nitroprusside) ของบริษัท FLUKA,Switzreland.

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) ของบริษัท CARLOERBA, Italy.

โซเดียมไฮดรอกไซด์ ของบริษัท AJAX CHEMICALS, Australia.

โซเดียมไฮโปคลอไรต์ ของบริษัท CARLOERBA, Italy.

กรดโครโตนิค ของบริษัท SIGMA, USA

โซเดียมไฮดรอกไซด์ ของบริษัท EKA NOVEL, Sweden.

แอมโมเนียมคลอไรด์ ของบริษัท CARLOERBA, Italy.

30% แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ของบริษัท CARLOERBA, Italy.

85% กรดฟอสฟอริค ของบริษัท CARLOERBA, Italy.

อะซิโตรไนไทรล์ (CH_3CN) ของบริษัท CARLOERBA, Italy.

4.3 <u>เชื้อจุลินทรีย์</u>

ในการทดลองใช้เชื้อ *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697 สั่งซื้อจาก American type culture collection ประเทศสหรัฐอเมริกา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 <u>อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์</u>

อาหารสูตรเกลือแร่ (Mineral salts medium) ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

- ฟรุกโตส	20	กรัม
- สารสกัดจากยีสต์	0.1	กรัม

- สารละลายเกลือ (salt solution) ประกอบด้วย

I 17407965

แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]	2	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต [KH_2PO_4]	2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต [Na_2HPO_4]	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต [$MgSO_4.7H_2O$]	0.2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ [$CaCl_2$]	20	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟต [$ZnSO_4.7H_2O$]	1.6	มิลลิกรัม
เฟอรัสซัลเฟต [$FeSO_4.7H_2O$]	0.3	มิลลิกรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดต [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$]	0.6	มิลลิกรัม
บอริคแอซิด [H_3BO_3]	0.6	มิลลิกรัม

ในการเตรียมอาหารสูตรเกลือแร่ ต้องแยกทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่ความดัน 1.5 บาร์ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 3 โมลาร์

4.5 <u>วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์</u>

4.5.1 การเก็บระยะสั้น

เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) สำหรับเก็บรักษาเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญดีแล้ว นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งวิธีนี้สามารถเก็บเชื้อจุลินทรีย์ได้นานประมาณ 1 เดือน

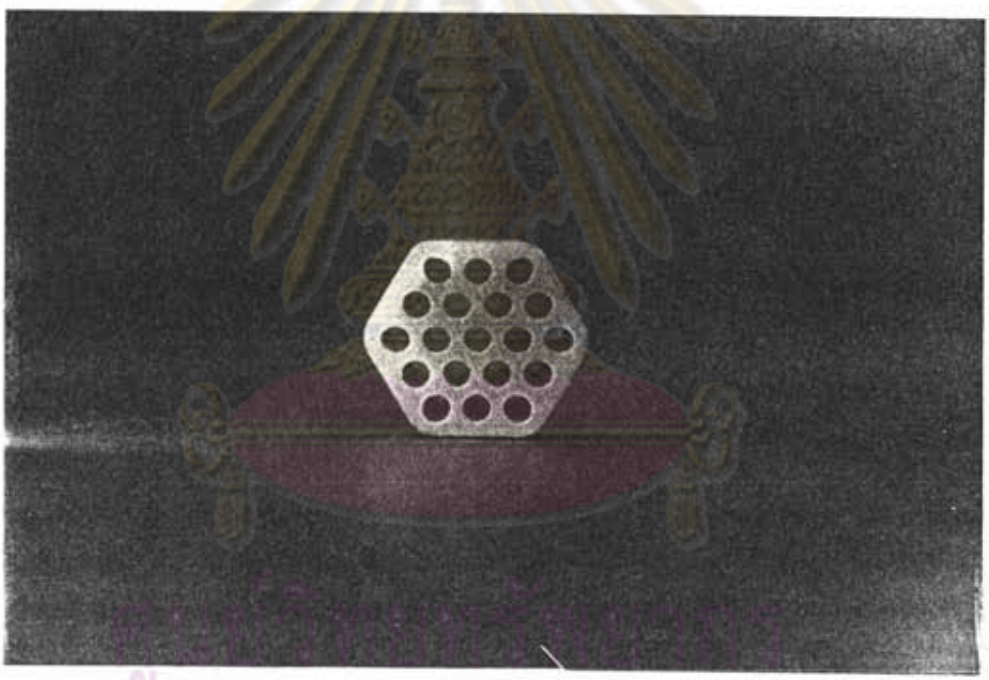
4.5.2 การเก็บในพาราฟินเหลว

เติมพาราฟินเหลว (liquid parafin) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลงบนผิวหน้าอาหารแข็งเอียงที่มีเชื้อเจริญดีแล้ว นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส วิธีนี้สามารถเก็บเชื้อจุลินทรีย์ได้นานประมาณ 1 ปี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 ระบบการเวียนเซลล์กลับ

ในระบบการเวียนเซลล์กลับประกอบด้วย ตัวกรองเซรามิกเป็นไมโครฟิลเตอร์ชนิด 1M-1 (ดังรูปที่ 4.1) ประกอบด้วยท่อคาร์บอน 19 ท่อ ซึ่งแต่ละท่อมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ยาว 85 เซนติเมตร มีพื้นที่การกรองทั้งหมดเท่ากับ 0.2030 ตารางเมตร และมีขนาดรูพรุนเท่ากับ 0.2 ไมโครเมตร โดยที่สารอาหารถูกป้อนด้วยปั๊มซึ่งถูกควบคุมโดยระบบควบคุมระดับ (level controller) ส่วนน้ำหมักจะไหลเข้าสู่ระบบการเวียนเซลล์กลับ ด้วยโรตารี่ปั๊ม (0.75 กิโลวัตต์) ซึ่งหมุนด้วยความเร็ว 0.465 เมตรต่อวินาที



รูปที่ 4.1 ลักษณะของตัวกรองเซรามิก (type 1M-1)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7 ขั้นตอนการทดลอง

4.7.1 การศึกษาลักษณะของเยื่อแผ่นไมโครฟิลเตรชัน

วัตถุประสงค์ในการศึกษานี้ เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในระบบการเวียนเซลล์กลับ โดยตัวแปรที่มีผลต่อการกรองคือ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของสาร

ละลายแขวนลอย อัตราการไหลในกระแสเวียนเซลล์กลับ และความดัน แต่ในกระบวนการหมักนี้ให้อุณหภูมิ และความเป็นกรดด่างคงที่ ฉะนั้นตัวแปรที่ศึกษาคือ ความดัน อัตราการไหลในกระแสเวียนเซลล์กลับ และความเข้มข้นของสารละลายแขวนลอย ดังแสดงในตารางที่ 4.1 รูปที่ 4.2 แสดงระบบของไมโครฟิลเตรชัน โดยที่น้ำหมักถูกปั๊มจากถังหมักโดยปั๊มผ่านไมโครฟิลเตรชันโมดูลและกลับสู่ถังหมัก และทำการวัดอัตราการไหลของเพอมิเอต

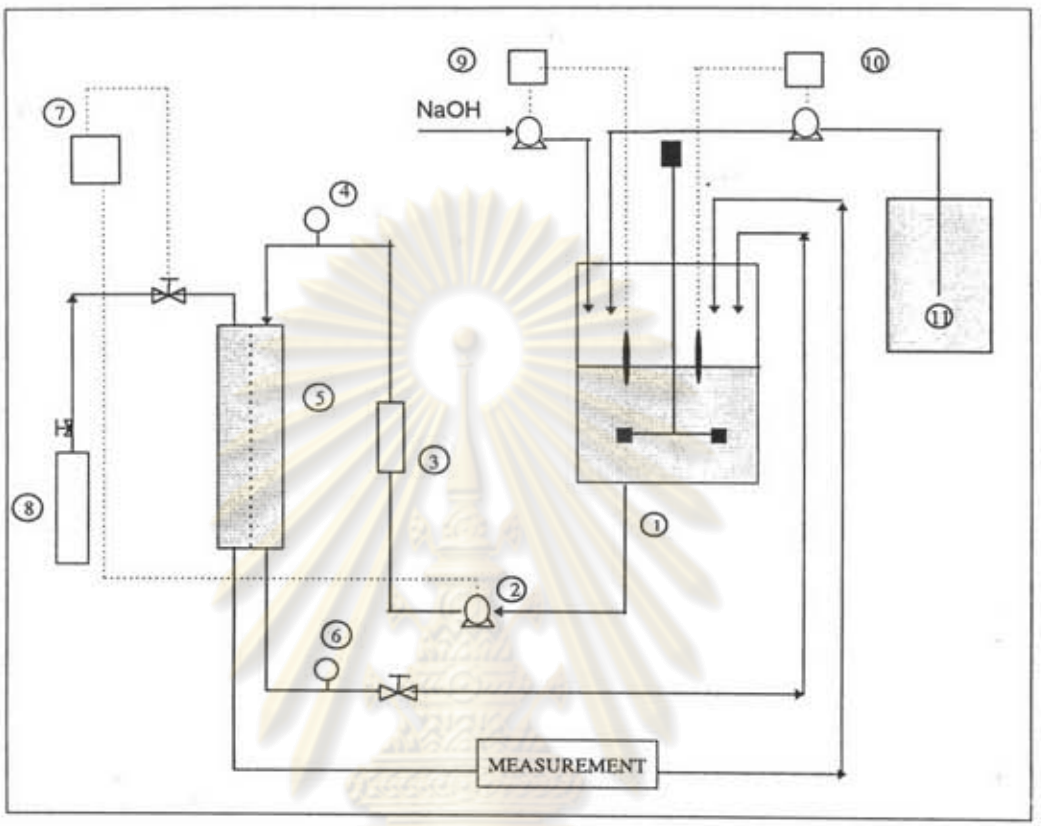
ตารางที่ 4.1 ตัวแปรที่ศึกษาในระบบไมโครฟิลเตรชันคือ ความดัน อัตราการไหลในกระแสเวียนเซลล์กลับ และความเข้มข้นของสารละลายแขวนลอย

ครั้งที่	ชนิดของของเหลว	ความดันขาเข้า (kg_f/cm^2)	อัตราการไหลในกระแสเวียนกลับ (m^3/hr)
1	น้ำกรอง	0^+	0.4, 0.5, 0.6
2	น้ำกรอง	0.2^+, 0.4^+, 0.6^+, 0.8^+	0.4
3	น้ำหมักที่มีเซลล์	0^+	0.4, 0.5, 0.6
4	เข้มข้น 2.57 กรัมต่อลิตร	0.2^+, 0.4^+, 0.6^+, 0.8^+	0.4
5	น้ำหมักที่มีเซลล์	0^+	0.4, 0.5, 0.6
6	เข้มข้น 7.67 กรัมต่อลิตร	0.2^+, 0.4^+, 0.6^+, 0.8^+	0.4
7	น้ำหมักที่มีเซลล์	0^+	0.4, 0.5, 0.6
8	เข้มข้น 15.0 กรัมต่อลิตร	0.2^+, 0.4^+, 0.6^+, 0.8^+	0.4

<u>หมายเหตุ</u>

ความดันขาเข้าที่มีเครื่องหมายบวก ดูภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.2 ระบบไมโครฟิลเตรชัน

1. ถังหมัก
2. ปั๊มกระแสเวียนกลับ
3. โรตามิเตอร์
4. มาตรวัดความดันขาเข้า
5. ไมโครฟิลเตรชันโมดูล
6. มาตรวัดความดันขาออก
7. ตู้ควบคุม
8. ถังกาซไนโตรเจน
9. ระบบควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง
10. ระบบควบคุมระดับ
11. ถังสารอาหาร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7.2 การล้างทำความสะอาดตัวกรอง

การล้างทำความสะอาดตัวกรอง สามารถล้างด้วยสารเคมีทั้งสารละลายกรดและด่าง แต่ในการทดลองนี้ ตัวกรองถูกล้างด้วยน้ำที่ผ่านเรซิน และแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5-2 เปอร์เซ็นต์ นาน 12-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำอีกครั้งหนึ่ง แล้วนำมาประกอบในระบบไมโครฟิลเตรชัน ต้องวัดค่าอัตราการไหลของเพอมิเอตน้ำ ให้

ได้ไม่ต่ำกว่าค่าที่กำหนดไว้ (13.20×10^{-3} ลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง ที่อัตราการไหลของกระแสเวียนกลับ 0.4 ลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง ความดัน 0.0^{+} กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าเยื่อแผ่นมีสภาพเหมือนกันทุกครั้งตลอดการทดลอง

4.7.3 การฆ่าเชื้อในระบบเวียนเซลล์กลับ

ระบบเวียนเซลล์กลับถูกฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำอิ่มตัว ที่ 100 องศาเซลเซียส โดยที่ในแต่ละจุดทำการฆ่าเชื้อเป็นเวลา 30 นาที ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อและอุปกรณ์อื่นๆ ทำการฆ่าเชื้อในหม้อฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่ความดัน 1.5 บาร์ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4.7.4 การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น

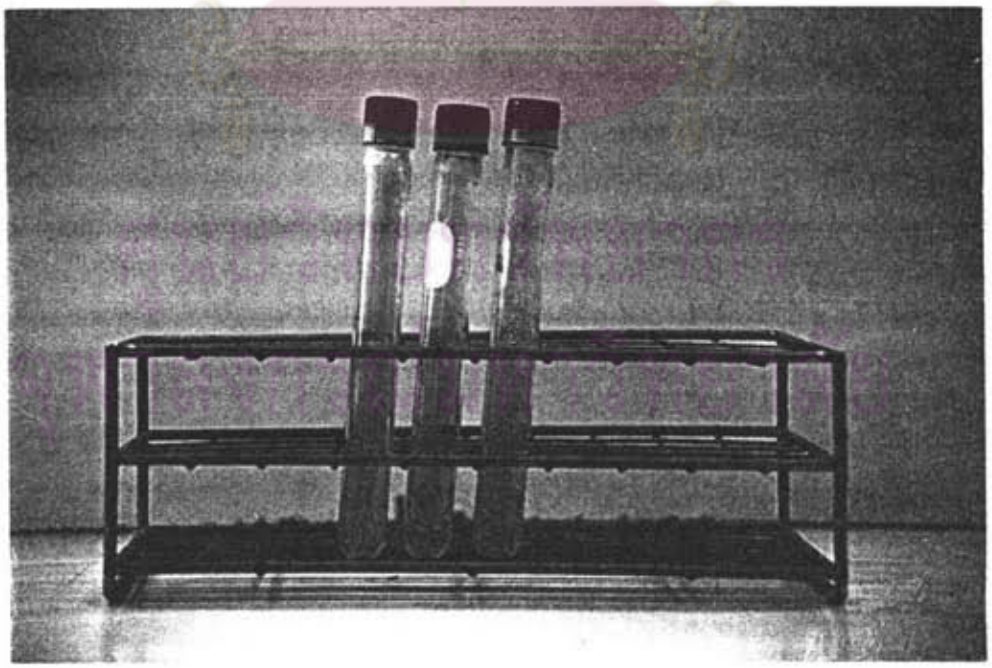
ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์จากเชื้อที่เก็บรักษาไว้ในอาหารแข็งเอียง (ดังรูปที่ 4.3) ลงในอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร ดังรูปที่ 4.4 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงปั่นแยกและล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วเจือจางเชื้อตั้งต้นให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในขั้นตอนนี้กระทำเพื่อที่จะให้ได้ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นเท่ากันทุกๆ การทดลอง โดยต้องกระทำการดังกล่าวด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technics)

4.7.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อในขวดแก้วทรงกรวย

ถ่ายเชื้อตั้งต้นจากข้อ 4.7.4 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 45 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ปริมาณน้ำตาล และปริมาณ PHB

4.7.6 การเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

ถ่ายเชื้อตั้งต้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร (จากข้อ 4.7.4) ลงในถังหมักขนาด 3 ลิตร ที่มีอาหารเหลว 1800 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7, อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เก็บตัวอย่างมา วิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย, ปริมาณน้ำตาล และปริมาณ PHB ตามเวลาทุกๆ 6 ชั่วโมง จนกระทั่งครบ 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารแข็งเอียง

4.7.7 การเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบเวียนเซลล์กลับ

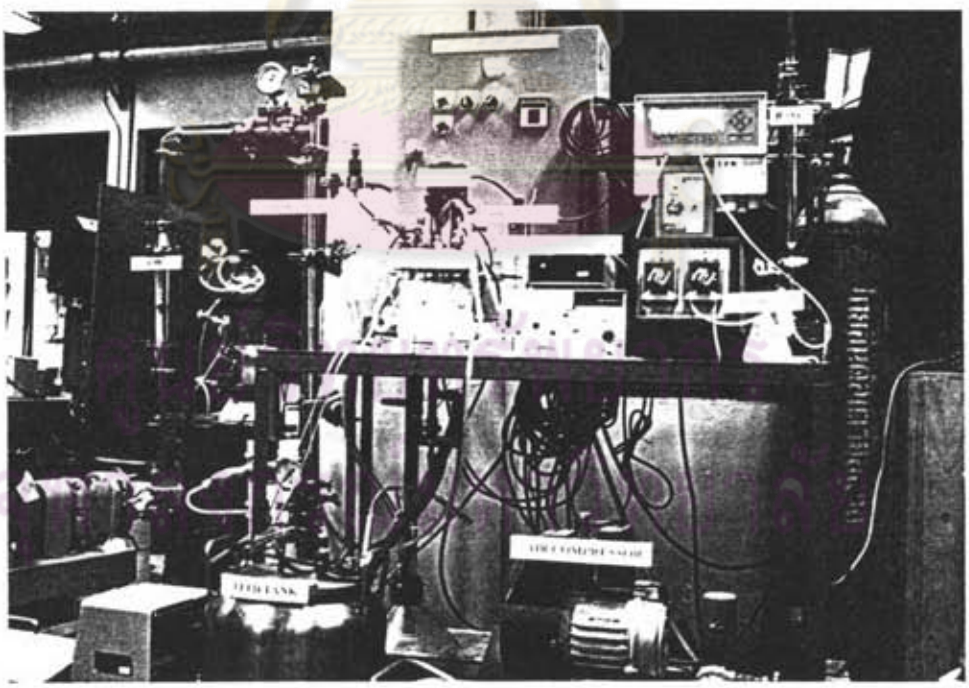
ในการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบเวียนเซลล์กลับ ดังแสดงในรูปที่ 4.5, 4.6 โดยเริ่มจากทำการเพาะเลี้ยงแบบไม่ต่อเนื่องที่มีการเวียนเซลล์กลับก่อน จนกระทั่งมีความเข้มข้นเซลล์คงที่ ถึงเริ่มทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่มีการเวียนเซลล์กลับ

4.7.7.1 การเพาะเลี้ยงแบบไม่ต่อเนื่องที่มีการเวียนเซลล์กลับ

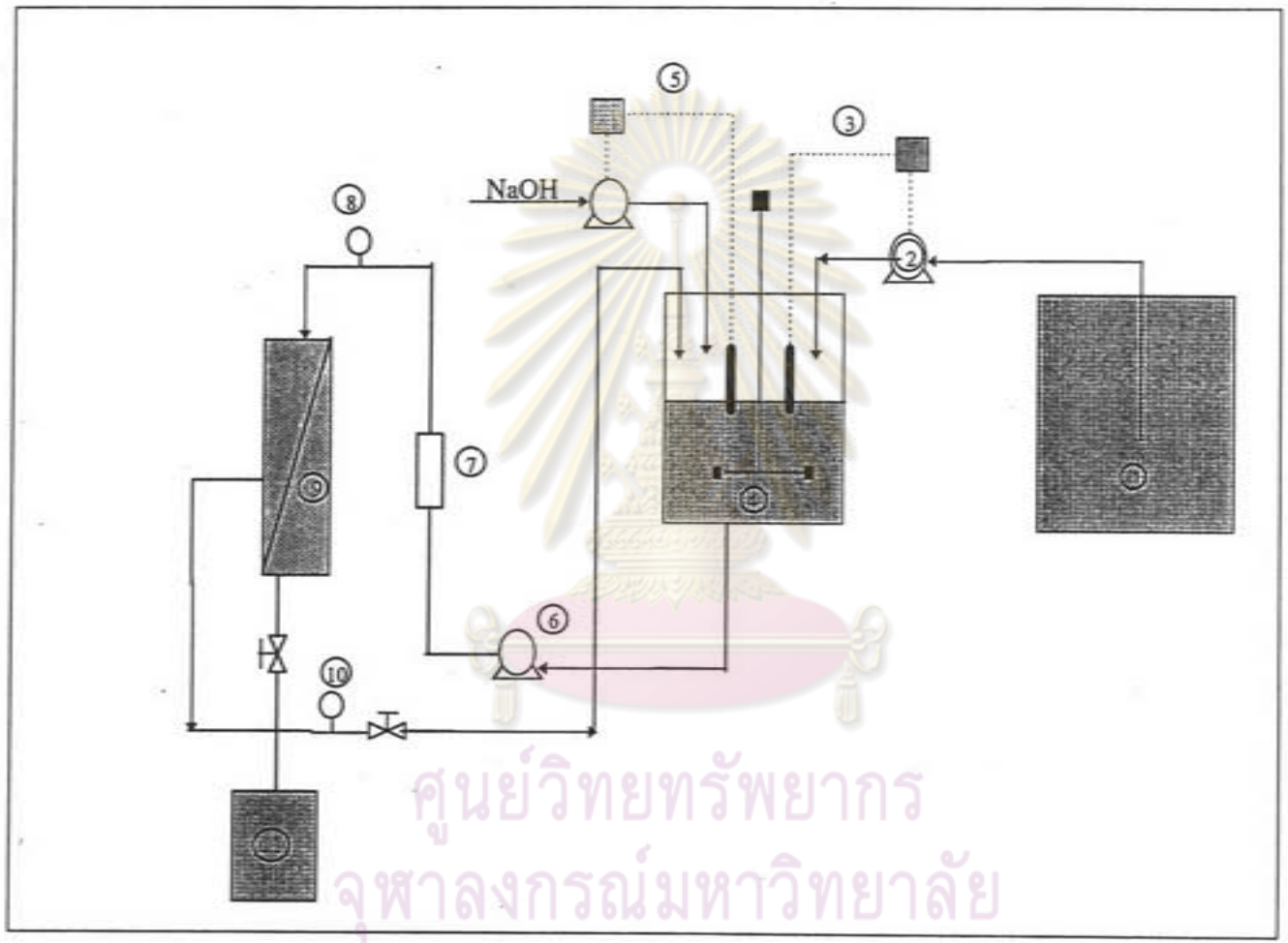
เริ่มจากถ่ายเชื้อตั้งต้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร (จากข้อ 4.7.4) ลงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีอาหารเหลว 900 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที โดยควบคุมความเป็นกรดด่างให้มีค่าเท่ากับ 7 ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.4 หัวเชื้อตั้งต้น ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร



รูปที่ 4.5 ภาพถ่ายแสดงการผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ในถังปฏิกรณ์ชีวมวลด้วยไมโครฟิลเตรชัน



รูปที่ 4.6 แผนภาพแสดงการผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ในถังปฏิกรณ์ชีวมวลด้วยไมโครฟิลเตรชัน (ดัดแปลงจาก Muenduen ,1989)

1. ถังสารอาหาร 2. ปั๊ม 3. ระบบควบคุมระดับ 4. ถังหมัก 5. ระบบควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง 6. ปั๊มกระแสเวียนเซลล์กลับ
7. โรตามิเตอร์ 8. มาตรวัดความดันขาเข้า 9. ไมโครฟิลเตรชันโมดูล 10. มาตรวัดความดันขาออก 11. ถังเก็บเพอมิเอต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลังจากเชื้อจุลินทรีย์เจริญ จนกระทั่งมีความเข้มข้นเซลล์คงที่ หรือความเข้มข้นของฟรุกโตสเหลือประมาณ 1 กรัมต่อลิตร ทำการป้อนสารอาหารเข้าไปในถังหมักอีก 1.9 ลิตร แล้วทำการเปิดปั๊มกระแสเวียนกลับ เลี้ยงเชื้อจนกระทั่งมีความเข้มข้นเซลล์คงที่ หรือความเข้มข้นของฟรุกโตสเหลือประมาณ 1.0 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ปริมาณน้ำตาล และปริมาณ PHB

4.7.7.2 การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่มีการเวียนเซลล์กลับ

หลังจากเลี้ยงเชื้อจนกระทั่งมีความเข้มข้นเซลล์คงที่ หรือความเข้มข้นของฟรุกโตสเหลือประมาณ 1.0 กรัมต่อลิตร จะทำการป้อนสารอาหารเข้าสู่ถังหมักด้วยปั๊ม ซึ่งปั๊มนี้ถูกควบคุมด้วยระบบควบคุมระดับในถังหมัก เพื่อให้ปริมาตรในถังหมักคงที่ ขณะเดียวกันทำการเปิด เพอมิเอตออกในอัตราการไหล (Q) ให้สอดคล้องกับอัตราการเจือจาง (D) โดยนิยามอัตราการเจือจาง (dilution rate ; D=Q/V) คืออัตราการไหลของเพอมิเอต (Q) ต่อปริมาตรของเหลวในถังหมัก (V) อัตราการเจือจางแรกที่ควบคุมคือ 0.1 ต่อชั่วโมง จนกระทั่งความเข้มข้นเซลล์คงที่ หลังจากนั้นเปลี่ยนอัตราการเจือจางเป็น 0.15, 0.2 , 0.25 และ 0.30 ต่อชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย, ปริมาณน้ำตาล และปริมาณ PHB

4.7.7.3 การควบคุมอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน

จากข้อ 4.7.7.2 เมื่อได้อัตราการเจือจางที่เหมาะสมแล้ว ทำการทดลองที่อัตราการเจือจางที่เหมาะนี้ จนกระทั่งมีความเข้มข้นเซลล์คงที่แล้ว ทำการเปลี่ยนสารอาหารที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่างๆกัน โดยเริ่มจากสารอาหารที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัมต่อลิตร และทำการเปลี่ยนตัวปรับความเป็นกรดด่างจากแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นโซเดียมไฮดรอกไซด์ 3 โมลาร์ หลังจากนั้นเปลี่ยนความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.5 และ 2 กรัมต่อลิตร ในครั้งต่อไป เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ปริทาณเชื้อแบคทีเรีย ปริมาณน้ำตาล และปริมาณ PHB

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8 การวัดการเจริญของเชื้อ

4.8.1 การวัดความขุ่น (turbidity)

ปิเปตน้ำหมัก 5 มิลลิลิตร ปั่นแยกและล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จากนั้นกระจายเซลล์ในน้ำกลั่นปริมาตรเท่าเดิม

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโมเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ (blank)

4.8.2 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight)

ปิเปตน้ำหมัก 5 มิลลิลิตร ปั่นแยกและล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ถ่ายเซลล์ลงในถ้วยอะลูมิเนียมที่อบแห้ง และทราบน้ำหนักแล้ว

นำไปอบในตู้อบที่ 90 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ หลังจากนั้นนำมาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยไว้ให้เย็น นำมาชั่งน้ำหนักอีกครั้งหนึ่ง

4.9 การหาปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส (Ashwell,1966)

ปิเปตน้ำหมัก 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิกรีเอเจนต์ (Dinitrosalicylic acid reagent : DNSA reagent) ลงไป 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็นลง เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วหาปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตรฐาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หมายเหตุ วิธีเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิกรีเอเจนต์

เตรียมโดยละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาณ 20 มิลลิลิตร เติมโซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตรท 30 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน บรรจุในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4.10 การหาปริมาณไนโตรเจนในสารละลาย (Berthelot reaction) (Sonnleitner และคณะ, 1979)

ปิเปตน้ำหมัก 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอ 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติมสารละลายบี 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 630 นาโมเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์

หมายเหตุ วิธีเตรียมสารละลายเอ และบี

สารละลายเอ ประกอบด้วย ฟีนอล 10 กรัมต่อลิตร และโซเดียมไนโตรพรัสไซด์ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

สารละลายบี ประกอบด้วย ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 90 กรัมต่อลิตร โซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 กรัมต่อลิตร และโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10 มิลลิลิตรต่อลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.11 <u>การวิเคราะห์ปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต</u> (Siddiqui และคณะ,1992)

4.11.1 การเตรียมสารละลายกรดโครโตนิค (crotonic acid) มาตรฐาน

โดยชั่งกรดโครโตนิคอย่างละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) แล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นตามต้องการ

4.11.2 การเตรียมวัฏภาคไหล (Mobile phase)

วัฏภาคไหลประกอบด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์อะซิโตรไนไทรล์ในกรดฟอสฟอริค 20 มิลลิโมลาร์ ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 2.9 ไปกรองโดยใช้เครื่องกรองสูญญากาศผ่านแผ่นกรองชนิดกรองน้ำ ที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปไล่ฟองอากาศที่ละลายอยู่ในวัฏภาคไหลด้วยเครื่องอุลตราโซนิค

4.11.3 การเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

- ย่อยเซลล์ด้วยสารละลาย 4.4 เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

- เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

- นำตะกอนมาล้างด้วยเอทานอล จากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนที่ความเร็วเดิม นำตะกอนที่ได้ไปอบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียส

- เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร ลงในตะกอนที่อบแห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นทันที และเจือจางด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 2.9 จากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไว้วิเคราะห์ปริมาณ PHB ด้วยเครื่อง HPLC

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.11.4 การวิเคราะห์ปริมาณ PHB ด้วยเครื่อง HPLC

- ทำให้คอลัมน์อยู่ในภาวะคงที่ด้วยวัฏภาคไหล โดยชะในอัตรา 1.5 มิลลิลิตร ต่อนาที ผ่าน μ Bondapax C_{18} ตรวจวัดด้วย 996 Photodiode Array Detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และทำการอินทิเกรทด้วยเครื่องอินทิเกรเตอร์

- เมื่อคอลัมน์อยู่ในภาวะคงที่แล้ว ฉีดสารละลายกรดโครโตนิคมาตรฐานเข้าไปในอินเจคเตอร์ 3 ไมโครลิตร ด้วยเครื่อง 717 Autosampler บันทึกผลไว้ เพื่อใช้เป็นสารละลายมาตรฐานในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง

- ฉีดสารตัวอย่างเข้าไปในอินเจคเตอร์ 15 ไมโครลิตร แล้วบันทึกผลไว้เปรียบเทียบหาปริมาณ PHB กับสารละลายกรดโครโตนิคมาตรฐาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย