บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

3.1.1 อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต,ประเทศ
- เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (gas chromatography) รุ่น 3400CX	Varian, USA.
แคปพิลลารี คอลัมน์ (capillary column) ชนิด carbowax-PEG เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มม. ความยาว 60 ม.	Restex, USA.
เครื่องผลิตก๊าซไฮโดรเจน (hydrogen generator) รุ่น 9200	Packard, USA.
เครื่องผลิตอากาศ (air compressor) รุ่น WL505000AJ	Campbell Hausfeld, USA.
- เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)	Waters, USA.
คอลัมน์ (ion exclusion column) Aminex รุ่น HPX-87H เส้นผ่านศูนย์กลาง 7.8 มม. ความยาว 300 มม.	Bio-Rad, USA.
เครื่องตรวจสอบ RI (Differential Refractometer detector) รุ่น 410	Waters, USA.
เครื่องพิมพ์ (Printer) รุ่น Data Module 746	Waters, USA.
- เครื่องควบแน่น (Rotary Vacuum Evaporator) รุ่น N-N series	Eyela, Tokyo, Japan
เครื่องควบคุมสูญญากาศ (Vacuum Controller) รุ่น NVC-1100	Eyela, Tokyo, Japan
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Digital Water Bath) รุ่น SB-651	Eyela, Tokyo, Japan
อุปกรณ์หล่อเย็น (Circulation Cooler) รุ่น CA-1111	B.U.Chi, Switzerland
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psycrotherm incubator shaker) รุ่น G27 แบบหมุน (rotary)	New Brunswick Scientific, USA.
- เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น A200S	Sartorious, Germany
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)	Beckman, USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ Avanti รุ่น J-30I	Beckman, USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ Mikro รุ่น 22R	Hettich,Germany
- เครื่องระเหิดแห้ง (Lyophillizer) รุ่น Eyela FD-1	Eyela, Tokyo, Japan
- เครื่องสั่นสะเทือนด้วยคลื่นแม่เหล็ก (Sonicator) รุ่น RK100	Bio-Rad, USA.

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต,ประเทศ
- เครื่องทำอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซีส (agarose gel electrophoresis)	Bio-Rad, USA.
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Thermospectronic) รุ่น genesys 20	USA.
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/Vis spectrometer) รุ่น Lambda 25	PerkinElmer, USA.
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Peltier Temperature Programmer) รุ่น PTP1	PerkinElmer, USA.
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น ion check 10	Tokyo Rikakikai, Japan
- เครื่องให้ความร้อน (stirring hot plate) รุ่น DS 201 HS	DMS, Japan
- ถังหมัก (fermentor) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MD-300	L.E. Marubishi, Tokyo, Japan
- ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124	Canada
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UL-60	ISSCO, USA.
- ตู้อบแห้ง (dryer oven)	Gilson, France
- ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 20 100 200 และ 1,000 มล.	Gilson, France
- หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave)	Julado, Germany
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W760	Memmert, Germany

3.1.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
กรดซัลฟูริก [H_2SO_4]	E.Merck Damstadt, Germany
กรดซิตริก [$C_6H_8O_7.H_2O$]	Reidel, England
กรดบอริก [H_3BO_3]	E.Merck Damstadt, Germany
กรดเบนโซอิก [$C_7H_6O_2$]	J.T.Baker, USA.
กรดมาเลอิก [$C_4H_4O_4$]	Fluka, Germany
คลอโรฟอร์ม [CH_3Cl]	E.Merck Damstadt, Germany
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต [$CuSO_4.5H_2O$]	Carlo Erba, Italy
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต [$CaCl_2.2H_2O$]	E.Merck Damstadt, Germany
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต [$CoCl_2.6H_2O$]	Carlo Erba, Italy
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต [$ZnSO_4.7H_2O$]	Carlo Erba, Italy

สารเคมี	
โซเดียมอะซิเตต [CH_3COONa]	E.Merck Damstadt, Germany
โซเดียมคลอไรด์ [NaCl]	ปรุงทิพย์, ไทย
โซเดียมไฮดรอกไซด์ [NaOH]	Carlo Erba, Italy
โซเดียมไฮโปคลอไรท์ [NaOCl]	Clorox, USA.
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต [Na_2HPO_4]	Fluka, Germany
ทรีสมาเบส [Trisma base]	Sigma Chemical, USA
Nicotinamide Adenine Dinucleotide, oxidized form [NAD]	Sigma Chemical, USA
Nicotinamide Adenine Dinucleotide, reduced form [NADH]	Sigma Chemical, USA
นิคเกิลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต [$NiCl_2.6H_2O$]	E.Merck Damstadt, Germany
น้ำตาลทราย	มิตรผล, ไทย
พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต [PHB]	Sigma Chemical, USA.
พอลิเปปโตน [polypeptone]	Becton Dickinson, USA.
โพแตสเซียมคลอไรด์ [KCl]	Carlo Erba, Italy
โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต [KH_2PO_4]	Carlo Erba, Italy
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต [$FeSO_4.7H_2O$]	Unilab, USA.
เมทานอล [CH_3OH]	E. Merck Damstadt, Germany
ยูเรีย [N_2H_4CO]	E. Merck Damstadt, Germany
สารสกัดจากเนื้อ [beef extract]	Difco, USA.
สารสกัดจากยีสต์ [yeast extract]	Difco, USA.
เอนไซม์อินเวอร์เทส [grade V EC3.2.1.26]	Sigma Chemical,USA.
เอนไซม์ยูเรียเอส [urease, EC3.5.1.5]	E. Merck Damstadt, Germany
แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$]	J.T.Baker,USA.

3.2 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้คือ *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งคัดเลือกโดย รัตนศิริ มุทิตากุล (2538)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (stock culture medium) **ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย**

สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
พอลิเปปโตน	5	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (การนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน)

3.3.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed culture medium) **ใช้สูตรของ** Doi **และคณะ (1986) ซึ่งศึกษาปรับปรุงโดย สุดา สุภาชวินสวัสดิ์ (2542) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย**

สารสกัดจากยีสต์	10	กรัม
พอลิเปปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
น้ำตาลทราย	10	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน แยกสารละลายน้ำตาลนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.3.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการสร้างและสะสม PHB **คือ** Mineral Salt Medium (MSM) **ซึ่งปรับปรุงโดย อดิพล บุญเรืองถาวร (2543) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย**

น้ำตาลทราย	20	กรัม
ยูเรีย	0.46	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	2	กรัม

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.1	กรัม
กรดซิตริก	0.75	กรัม
สารละลาย trace element	1	มิลลิลิตร

แยกละลายเกลือแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตและ trace element เมื่อละลายแล้วจึงนำมารวมกัน ปรับ pH 6.0 และนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน ส่วนของสารละลายน้ำตาลแยกฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

สารละลาย trace element สูตรที่ 2 ใน 1 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก 1 ลิตร ประกอบด้วย

แคลเซียมคลอไรด์	20	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	1.3	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดต	0.6	กรัม
กรดบอริก	0.6	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต	0.08	กรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	0.50	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต	0.05	กรัม
นิกเกิลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	0.02	กรัม

3.4 วิธีการเก็บรักษาเชื้อและเตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

3.4.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) สำหรับเก็บรักษาเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เททับด้วยพาราฟินปลอดเชื้อแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.2 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเป็นกล้าเชื้อ

นำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ตามข้อ 3.4.1 มาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในสารละลายนอร์มอลซาไลน์ (normal saline หรือสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์) เพื่อเป็นสารละลายแขวนลอย ปรับความเข้มข้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.4

3.5 การเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในภาวะที่เหมาะสม เพื่อนำเซลล์ที่มีการสะสม PHB มาใช้ผลิตโมโนเมอร์ R3HB โดยปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์

3.5.1 การผลิต PHB โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 3.4.2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (สุดา สุภาชวินสวัสดิ์, 2542) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (4 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) บรรจุในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร เลี้ยงกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Mineral Salt Medium (MSM) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร (4 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) บรรจุในขวดทดลองปริมาตร 500 มิลลิลิตร ใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส, pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.0 เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 12, 18, 24 และ 30 นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB ที่ผลิตได้

3.5.2 ผลของปริมาณสารละลาย trace element ต่อการผลิต PHB

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 3.4.2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร เลี้ยงกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงในอาหาร MSM ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เปรียบเทียบการเติบโตและการผลิต PHB ใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน เติมสารละลาย trace element สูตรที่ 2 ปริมาตร 1 และ 2 มิลลิลิตรต่อลิตร ซึ่งบรรจุในขวดทดลองปริมาตร 500 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.0 เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อ

นาที เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 12, 18, 24 และ 30 นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB ที่ผลิตได้

3.6 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ในการผลิตโมโนเมอร์ R3HB

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus sp.* BA-019 ตามข้อ 3.5.2 นำไปปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ล้างเซลล์ด้วยสารละลายนอร์มอลซาไลน์ 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปกระจายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 150มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ บ่มสารผสมปฏิกิริยา (reaction mixture) ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการเขย่า เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน โดยวัดจากปริมาณการผลิตโมโนเมอร์ R3HB

คำนวณผลผลิตของโมโนเมอร์ R3HB ที่ได้เป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต (%yield) และความเข้มข้นของ R3HB เป็นกรัมต่อลิตร (Lee และคณะ, 1999)

3.7 ผลของการเขย่าที่มีต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ในการผลิตโมโนเมอร์ R3HB

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus sp.* BA-019 ตามข้อ 3.5.2 นำไปปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ล้างเซลล์ด้วยสารละลายนอร์มอลซาไลน์ 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปกระจายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 150มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 บ่มสารผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิที่เหมาะสมตามข้อ 3.6 เปรียบเทียบอัตราการเขย่า 100, 200, 250 รอบต่อนาที และไม่เขย่า เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันโดยวัดจากปริมาณการผลิตโมโนเมอร์ R3HB

คำนวณผลผลิตของโมโนเมอร์ R3HB ที่ได้เป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต และความเข้มข้นของ R3HB เป็นกรัมต่อลิตร (Lee และคณะ, 1999)

3.8 ผลของค่า pH ที่มีต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ในการผลิตโมโนเมอร์ R3HB

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus sp.* BA-019 ตามข้อ 3.5.2 นำไปปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ล้างเซลล์ด้วยสารละลายนอร์มอลซาไลน์ 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปกระจายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 150มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตร เปรียบเทียบผลของค่า pH เริ่มต้นที่ไม่ได้ควบคุม และค่า pH ที่ควบคุมด้วยบัฟเฟอร์ที่มีต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน โดยแปรค่า pH ช่วง 2.0-10.0 บ่มสารผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.6 โดยไม่มีการเขย่า เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันโดยวัดจากปริมาณการผลิตโมโนเมอร์ R3HB

คำนวณผลผลิตของโมโนเมอร์ R3HB ที่ได้เป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต และความเข้มข้นของ R3HB เป็นกรัมต่อลิตร (Lee และคณะ, 1999)

3.9 การตรวจหาปริมาณโมโนเมอร์ R3HB ภายในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ภายหลังการทำปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน

นำเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 จากการศึกษาในข้อ 3.8 ภายหลังจากการทำปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH เท่ากับ 5.5 และ 4.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งเป็นภาวะที่เซลล์มีการผลิตโมโนเมอร์ R3HB สูงที่สุด และต่ำที่สุดตามลำดับ โดยนำเซลล์มาล้างด้วยสารละลายนอร์มอลซาไลน์ 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์มาบดกับอะลูมินาอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 15 นาที ปั่นแยกเซลล์ออก นำของเหลวภายในเซลล์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโมโนเมอร์ R3HB ภายในเซลล์ ตามวิธีข้อ 3.14.5

3.10 การตรวจหาปริมาณ PHB ที่เหลืออยู่ภายในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ภายหลังการทำปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน

นำเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 จากการศึกษาในข้อ 3.8 ภายหลังจากการทำปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH ในช่วงเท่ากับ 4.0-9.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ไปวิเคราะห์หาปริมาณ PHB ที่เหลืออยู่ภายในเซลล์ ตามวิธีข้อ 3.14.4

3.11 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase

3.11.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ตามวิธีข้อ 3.5.2 ไปปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.13 โมลาร์ (วนิดา วัฒนการุณ, 2536) pH เท่ากับ 7.0 จำนวน 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ไปบดด้วยอะลูมินา (อัตราส่วนเซลล์ต่ออะลูมินาเท่ากับ 1:1) ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.13 โมลาร์, pH เท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15นาที ปั่นแยกเซลล์ออก นำ crude enzyme extract ที่ได้ไปหากิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase แปรค่าอุณหภูมิขณะทำปฏิกิริยาที่ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส โดยหากิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase จากอัตราการเกิด NADH

กำหนดกิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase (U.mg protein^{-1}) เท่ากับปริมาณ NADH ที่ผลิตขึ้น 1 ไมโครโมล ภายในระยะเวลา 1 นาที

3.11.2 ศึกษาผลของค่า pH ที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ตามวิธีข้อ 3.5.2 ไปปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.13 โมลาร์, pH เท่ากับ 7.0 จำนวน 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ไปบดด้วยอะลูมินา (อัตราส่วนเซลล์ต่ออะลูมินาเท่ากับ 1:1) ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.13 โมลาร์, pH เท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15นาที ปั่นแยกเซลล์ออก นำ crude enzyme extract ที่ได้ไปหากิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase แปรค่า pH ของปฏิกิริยาเท่ากับ 4.0-9.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ศึกษาจากข้อ 3.11.1 โดยหากิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase จากอัตราการเกิด NADH

กำหนดกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase (U.mg protein^{-1}) เท่ากับปริมาณ NADH ที่ผลิตขึ้น 1 ไมโครโมล ภายในระยะเวลา 1 นาที

3.12 ศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนเมอร์ที่ผลิตได้ด้วยโปรตอน NMR

3.12.1 การขยายส่วนการผลิตโมโนเมอร์ R3HB สำหรับทำให้บริสุทธิ์ โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดทดลองขนาด 2 ลิตร

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ตามวิธีข้อ 3.5.2 ปริมาตรรวม 1.5 ลิตร นำน้ำหมักไปปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85 เปอร์เซ็นต์) 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปกระจายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1.5 ลิตร บรรจุในขวดเขย่าขนาด 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ และค่า pH ที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.6 และ 3.8 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน โดยวัดจากอัตราการผลิตโมโนเมอร์ R3HB

คำนวณผลผลิตของโมโนเมอร์ R3HB ที่ได้เป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต และความเข้มข้นของ R3HB เป็นกรัมต่อลิตร (Lee และคณะ, 1999)

นำสารละลายโมโนเมอร์ R3HB ที่ได้จากสารผสมปฏิกิริยาปริมาตรรวม 1.5 ลิตรมาปรับ pH เท่ากับ 11.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ นำไปสกัดด้วยคลอโรฟอร์มเพื่อกำจัดไขมันส่วนที่ไม่ต้องการ จะได้โมโนเมอร์ R3HB ละลายอยู่ในชั้นน้ำ (aqueous phase) นำส่วนนี้ไปอบแห้ง จากนั้นละลายด้วยเอทานอล กรอง และนำไปอบแห้งอีกครั้ง ได้โมโนเมอร์ R3HB มีความบริสุทธิ์อยู่ในรูปของเกลือโซเดียม แล้ววิเคราะห์โครงสร้างของโมโนเมอร์ R3HB ด้วยโปรตอน NMR (Lee และคณะ,1999)

ในการศึกษาปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันในขวดทดลองที่มีการควบคุมค่า pH ในช่วง 4.0-6.0 โดยใช้อะซิเตตบัฟเฟอร์ พบว่าในสารผสมปฏิกิริยาที่เตรียมเพื่อทำให้บริสุทธิ์ (ข้อ 3.12.1) ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรตอน NMR ได้พบ peak ซึ่งมี retention time ตรงกับสารอะซิเตต ซึ่งพิจารณาแล้วมีความเป็นไปได้ว่า ในสารผสมปฏิกิริยาที่ควบคุมค่า pH โดยใช้อะซิเตตบัฟเฟอร์ สารอะซิเตตอาจมาจากบัฟเฟอร์ที่ใช้ เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงทำปฏิกิริยาในถังหมัก เนื่องจากสามารถควบคุมค่า pH ตลอดระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาด้วยกรดไฮโดรคลอริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์

3.12.2 การผลิต PHB โดยการเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

เพื่อให้ได้ปริมาณ PHB มากเพียงพอ เพื่อนำไปผลิตโมโนเมอร์ R3HB ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 3.4.2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ปริมาตรรวม 120 มิลลิลิตร (4 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ถ่ายเชื้อลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีปริมาตรอาหาร MSM เริ่มต้น 3 ลิตร ใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน เติมสารละลาย trace element สูตรที่ 2 ปริมาตรที่ศึกษาได้จากข้อ 3.5.2 ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.0 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB ที่ผลิตได้

3.12.3 ศึกษาการผลิตโมโนเมอร์ R3HB โดยการเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

นำเซลล์หลังจากปั่นแยกออกจากน้ำหมักที่เลี้ยงได้จากข้อ 3.12.2 ไปกระจายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิ และค่า pH ที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.6, 3.8 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน โดยวัดจากปริมาณการผลิตโมโนเมอร์ R3HB

คำนวณผลผลิตของโมโนเมอร์ R3HB ที่ได้เป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต และความเข้มข้นของ R3HB เป็นกรัมต่อลิตร (Lee และคณะ, 1999)

3.13 การจัดจำแนกสปีชีส์ (species) ของ *Bacillus* sp. BA-019

จากรายงานของรัตนศิริ มุทิตากุล (2538) ที่ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา กับทางชีวเคมีตามหลักการใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Peter, 1986) สรุปว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 จัดอยู่ในจีนัส Bacillus แต่ยังไม่มีการศึกษาสปีชีส์ของ Bacillus สายพันธุ์นี้ ดังนั้นจึงได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอนเอ (16S ribosomal DNA) โดยขั้นตอนต่อไปนี้

3.13.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BA-019

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BA-019 ดัดแปลงจากวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของ *Bacillus* sp. BA-019 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง, ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที แขวนลอยเซลล์ด้วย lysis buffer I (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เติม lysis buffer II (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสที่ได้มาเติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 0.6 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ได้ กลับหลอดไปมาจนเกิดตะกอนดีเอ็นเอ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสออก ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ที่เย็น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำให้ดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.13.2 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร คำนวณค่า A_{260}/A_{280} ค่าที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 1.8-2.0

ถ้าค่า A_{260}/A_{280} มีค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่า มีโปรตีนปนเปื้อนสูง

ถ้าค่า A_{260}/A_{280} มีค่ามากกว่า 2.0 แสดงว่า มี RNA ปนเปื้อนสูง

คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $A_{260} \times 50 \times$ ค่าการเจือจาง

3.13.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยมีส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ออกแบบตามวิธีของ Blackall (1999) ดังนี้

สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)	1.5	มิลลิโมลาร์
สารละลาย dNTP	0.2	มิลลิโมลาร์
1x Taq DNA polymerase buffer Taq DNA polymerase	1.5	หน่วย

สารละลายไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณปลายทั้ง 2 ด้านของดีเอ็นเอแม่แบบ ซึ่งมีความเข้มข้น 200 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

Forward primer 10F	5' –AGTTTGATCCTGGCTC- 3'
Reverse primer 1540R	5' –AAGGAGGTGATCCAGCC- 3'

ดีเอ็นเอแม่แบบที่เตรียมได้ปริมาณ 1 พิโคกรัม – 1 ไมโครกรัม

ปรับปริมาตรสารผสมปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุให้มีปริมาตรสุทธิ 50 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ และควรเก็บในที่เย็น นำไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermol Cycler) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

Hot start	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที	
Denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	35 รอบ
Annealing	อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที	
Extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที	
Final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 นาที	

3.13.4 การแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอีเล็คโทรโฟเรซีส (Agarose gel Electrophoresis)

นำผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอีเล็คโทรโฟเรซีส ในอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ความต่างศักย์ไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นนำอะกาโรสเจลไปย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที ตรวจแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

3.13.5 การแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอสำเร็จรูป (gel extraction kit)

ตัดชิ้นอะกาโรสเจลตรงตำแหน่งที่มีดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการลงในหลอดไมโครฟิวจ์ สกัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล โดยใช้ชุดแยกดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, germany) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตดังนี้

เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนเจลหลอมหมด นำสารละลายที่ได้ใส่ลงใน QIAquick spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ QG อีกครั้ง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ PE 2 ครั้ง

นำคอลัมน์ไปต่อกับหลอดเก็บตัวอย่าง เติมน้ำกลั่นปลอดประจุ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนใสที่ได้กลับมาเติมลงในคอลัมน์เดิมอีกครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.13.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ (16S rDNA)

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้บริการของหน่วยบริการชีวภาพ (BIOSERVICE UNIT, BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 2 เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ จนครบ 1,500 เบส

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานไว้ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BlastX version 2.2.6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BA-019

Primer	**ลำดับนิวคลีโอไทด์** (5'-3')
10F Forward	AGTTTGATCCTGGCTC
350F Forward	TACGGGAGGCAGCAG
1240R Reverse	CCATTGTAGCACGTGT
1540R Reverse	AAGGAGGTGATCCAGCC

3.14 การวิเคราะห์

3.14.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตรมาปั่นแยกเซลล์ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปใส่ในถ้วยอลูมิเนียมกระดาษที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักถ้วยที่มีเซลล์อบแห้งจนคงที่ คำนวณหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.14.2 การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในรูปน้ำตาลรีดิวซ์

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์แล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายอินเวอร์เทส 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 4.5 บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธีของ Bernfeld (1955) โดยเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid, DNSA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร และน้ำตาลซูโครส (ภาคผนวก ค) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.14.3 การหาปริมาณยูเรีย

ใช้เอนไซม์ยูเรียเอส (urease) โดยนำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์แล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุตามความเหมาะสมปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ยูเรียเอส 7.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 6.1 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำมาวิเคราะห์หาปริมาณยูเรียโดยวิธีของ Kemper (1974) นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร และยูเรีย (ภาคผนวก ค) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.14.4 การวิเคราะห์หาปริมาณ PHB โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography : GC)

ตามวิธีของ Comeau และคณะ (1988) โดยปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์มาละลายในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เทใส่กระทงพลาสติก จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

ชั่งเซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัม ใส่หลอดฝาเกลียว เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น ร้อยละ 3 (3% acidified methanol) 2 มิลลิลิตร ที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บชั้นคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) ซึ่งมีอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ของโมโนเมอร์ไปสกัดแยกกรดและกากเซลล์ด้วยน้ำกลั่นตามวิธีข้างต้นอีกครั้ง ถ่ายชั้นคลอโรฟอร์มใส่หลอดฝาเกลียวสำหรับวิเคราะห์ด้วยวิธี GC ภายใต้ภาวะดังนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชนิดของคอลัมน์	:แคปพิลารีคอลัมน์ชนิด carbowax-PEG เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 60 เมตร
อุณหภูมิของ injector	:250 องศาเซลเซียส (isothermal)
อุณหภูมิของ column	:130 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 180 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ detector (FID)	:250 องศาเซลเซียส (isothermal)
Split ratio	:50 ต่อ 1
ก๊าซตัวพา	:ก๊าซไนโตรเจนอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	:1 ไมโครลิตร

3.14.5 การวิเคราะห์ปริมาณของโมโนเมอร์ R3HB ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)

เก็บตัวอย่างมา 5 มิลลิลิตร ปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำน้ำหมักที่ได้ไประเหยแห้ง เติมกรดซัลฟูริก 0.01 N ปริมาตร 980 ไมโครลิตร กับกรดมาเลอิกซึ่งเป็นสารมาตรฐานภายใน เข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นกรองผ่านชุดกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมครอน นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ภายใต้ภาวะดังนี้ (Lee และคณะ, 1999)

ชนิดของคอลัมน์	:คอลัมน์ชนิด organic acid รุ่น Aminex เส้นผ่านศูนย์กลาง 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 300 มิลลิเมตร
ชนิดของเครื่องตรวจสอบ	:Refractive Index Detector
อุณหภูมิของ detector (RI)	:30 องศาเซลเซียส
สารตัวพา	:กรดซัลฟูริก 0.01 N
อัตราการไหล	:0.5 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	:20 ไมโครลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.14.6 การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase ด้วยวิธี spectrometry

นำ crude enzyme extract ที่ได้ไปวิเคราะห์หากิจกรรมของ R3HB dehydrogenase โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของ NADH (ภาคผนวก ค) หน่วยเป็นไมโครโมล ซึ่งมีปฏิกิริยาดังตาราง

ตารางที่ 3 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase

Reaction mixture	Blank (µl)	Sample (µl)
สารมาตรฐาน R3HB 10 mM	-	30
NAD 0.4 mM	30	30
crude enzyme extract	30	30
Buffer	140	110

3.14.7 การหาปริมาณโปรตีน

ตามวิธีของ Lowry โดยนำ crude enzyme extract ที่ได้มาเจือจางตามความเหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Lowry C 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม Lowry D 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของ bovine serum albumin (BSA) (ภาคผนวก ค) หน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย