บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์ และ เคมีภัณฑ์

1.1 อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
เครื่องเขย่า(shaker) รุ่นG-10 แบบ rotary	New Brunswick Scientific,USA.
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psychrotherm incubater shaker) รุ่น G-27 แบบ rotary	New Brunswick Scientific, USA.
เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KS-3000P	Kobuta, Japan
เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21	Beckman, USA.
เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) L2200P	Sartorius, Germany
เครื่องชั่งละเอียด(analytical balance) S2000B	Beckman, USA.
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer) รุ่น UV-160	Shimadsu, Japan
เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan pH 1000	Eutech Cybernetics, USA.
ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-240	ISSCO, USA.
ตู้อบแห้ง (hot air oven)	Herson, England
ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (incubator)	Memmert, Germany
หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ(autoclave) รุ่น Tomy SS-325	SEIKO, Japan
เครื่องระเหิดแห้งระบบสุญญากาศ (lyophilizer) รุ่น Eyela FD-1	Tokyo Rikakikai, Japan

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	Memmert, Germany
เตาให้ความร้อน (stirring hot plate)	DMS, Japan
เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography) รุ่น 3400CX	Varian, USA.
เครื่องสำหรับฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ(auto sampler) รุ่น 8200CX	Varian, USA.
แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด cabowax-PEG ขนาด 60 mm.× 25 mm. ID.× 25 μ m.df	Restex, USA.
เครื่องผลิตก๊าซไฮโดรเจน (hydrogen generator) รุ่น 9200	Packard, USA.
เครื่องผลิตก๊าซออกซิเจน (air compressor) รุ่น WL 505000 AJ	Campbell Hausfeld, USA.
เครื่อง X-Ray powder diffractometer รุ่นPW 1830/0	Phillips, Holland
เครื่อง Universal testing machine รุ่น 5583	Instron, USA.
เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) รุ่น Perkin-Elmer DSC 7	Perkin Elmer & Co. GmbH , USA.
เครื่อง Gel Permeation Chromatography (GPC) รุ่น CV-150C	Waters, USA.
เครื่องมือวัดความหนาของแผ่นฟิล์ม รุ่น 7301	Mitutoyo, Japan
crucible pan cover รุ่น DSC 7 (AI 30 μl)	Perkin, USA.
เครื่องมือวัดระนาบพื้นผิว	Magnet, Germany
ชุดสกัดไขมัน (soxhlet apparatus)	Brand GMBH, Germany
เครื่องอุปกรณ์หล่อเย็น (circulation cooler)	Marubishi, Japan

2.1.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต , ประเทศ
กรดโพรพิโอนิก ($C_3H_6O_2$)	BDH,England
กรดบิวทิริก ($C_4H_8O_2$)	J.T. Baker , England
กรดวาเลอริก ($C_5H_{10}O_2$)	Sigma Chemical ,USA.
กรดอะซิติก ($C_2H_4O_2$)	E. Merk Damstadt , Germany
กรดกลูโคนิก ($C_6H_{12}O_7$)	Sigma Chemical , USA.
กรดซอร์บิก ($C_6H_8O_2$)	E. Merk Damstadt , Germany
กรดแลกติก ($C_3H_6O_2$)	E. Merk Damstadt , Germany
กรดซัคซินิก ($C_4H_6O_4$)	E. Merk Damstadt , Germany
กรดเบนโซอิก ($C_7H_6O_2$)	Nacalai tesque , Japan
กรดซัลฟุริกเข้มข้น	E. Merk Damstadt , Germany
โซเดียมอะซิเตต ($C_2H_3O_2Na$)	E. Merk Damstadt , Germany
โซเดียมซัคซิเนท ($C_4H_5O_2Na$)	E. Merk Damstadt , Germany
โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ($C_4H_7O_3Na$)	Sigma Chemical , USA.
พอลิ(บีต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) ,PHB	Sigma Chemical , USA.
พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-24%3ไฮดรอกซีวาเลอเรต) (3HB-co-24%3HV)	Aldrich chemical ,USA
ฟรุกโตส (analytical grade)	Fluka , Germany
ฟรุกโตส (food grade)	รามาโพรดักส์ , ไทย
กลูโคส	ป.ประเสริฐชัย , ไทย
ซูโครส	Fluka , Germany
น้ำตาลทรายขาว (มิตรผล)	น้ำตาลมิตรผล , ไทย
น้ำตาลทรายแดง	ตลาดสามย่าน , ไทย
กากน้ำตาล	สุราทิพย์ , ไทย
แอมโมเนียมซัลเฟต {$(NH_4)_2SO_4$}	E. Merk Damstadt , Germany
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($Na_2HPO_4.2H_2O$)	E. Merk Damstadt , Germany

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	E. Merk Damstadt , Germany
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	E. Merk Damstadt , Germany
แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต {$(NH_4)M_7O_{24}.4H_2O$}	J.T. Baker , USA.
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	E. Merk Damstadt , Germany
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	E. Merk Damstadt , Germany
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	E. Merk Damstadt , Germany
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	E. Merk Damstadt , Germany
กรดบอริก (H_3PO_3)	E. Merk Damstadt , Germany
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	May & Baker , USA.
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeS0_4.7H_2O$)	Carlo erba , Italy
เมทธานอล	BDH laboratory , England
เอทธานอล	BDH laboratory , England
เฮกเซน	J.T. Baker , USA
อะซิโตน	BDH laboratory , England
ไอโซออกเทน	J.T. Baker , USA
คลอโรฟอร์ม เกรด HPLC	J.T. Baker , USA
คลอโรฟอร์ม	BDH laboratory , England
สารมาตรฐานพอลิสไตรีนน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ	Tosoh , Japan
ได้แก่ 4.18×10^2 1.78×10^4	
1.78×10^4 3.49×10^4	
5.46×10^4 6.78×10^4	
2.34×10^5 2.06×10^7	

เคมีภัณฑ์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ

สารสกัดจากเนื้อ	Difco , USA.
สารสกัดจากยีสต์	Difco , USA.
พอลิเปปโตน	Becton Dickinson , USA.
เปปโตน	Difco , USA.

2.2. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้คือ *Bacillus* sp. BA-019 สามารถสร้างและสะสมพอลิบีตาไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHA) ซึ่งแยกและคัดเลือกโดย รัตนศิริ มุทิตากุล (2538)

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (stock culture medium) ใน 1 ลิตรประกอบด้วย

สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม

ปรับพีเอช เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที (การนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน)

2.3.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed culture medium) โดย Doi และคณะ(1986) ใน 1 ลิตรประกอบด้วย

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

ปรับพีเอช เป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน แยกสารละลายฟรุกโตส นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 °ซ เป็นเวลา 10 นาที

2.3.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิต PHA

MSM (Mineral Salt Medium) สูตรปรับปรุงโดย รัตนศิริ มุทิตากุล(2538) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

แอมโมเนียมซัลเฟต	1.0	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.0	กรัม

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	0.1	กรัม
แหล่งคาร์บอน	20.0	กรัม
สารละลายเกลือแร่	1.0	มิลลิลิตร

สารละลายเกลือแร่ ใน 1 โมลาร์ HCl ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แคลเซียมคลอไรด์	20.0	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	1.3	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดต	0.6	กรัม
กรดบอริก	0.6	กรัม

แยกละลายส่วนของสารละลายเกลือแร่ แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต และสารสกัดจากยีสต์ เมื่อละลายแล้วจึงนำมารวมกันและเติมสารละลายเกลือแร่ 1 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 6.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3 โมลาร์ นึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

2.4. วิธีการเก็บรักษาเชื้อและการเตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงเป็นกล้าเชื้อ

2.4.1การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อจุลินทรีย์มาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) ตามข้อ 2.3.1 โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ บ่มเชื้อที่ 30 ° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 ° ซ แล้วนำมาเขี่ยลากเชื้อ(streak) ลงบนอาหารใหม่ (subculture) ทุกๆ 1 เดือน และยังมีอีกวิธีหนึ่ง คือ การเติมพาราฟินเหลว(liquid parafin) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเททับบนผิวหน้าแข็งเอียงที่มีเชื้อเจริญอยู่ นำไปเก็บรักษาในตู้แช่แข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ –70 ° ซ เพื่อเป็น stock culture

2.4.2 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเป็นกล้าเชื้อ

นำเชื้อที่เก็บรักษาไว้มาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อใหม่ บ่มเชื้อที่ 30° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วถ่ายเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) กระจายเชื้อ (resuspend) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.70 ถ่ายสารผสมหัวเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับกล้าเชื้อ ตามข้อ 2.3.2

2.5. การศึกษาการเติบโตของ *Bacillus* sp. BA-019

2.5.1 วิธีหาน้ำหนักเซลล์เปียก โดยการใช้การคำนวณจากกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์เปียกและค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

นำน้ำหมักที่เก็บได้ในแต่ละช่วงเวลามาปั่นเซลล์ ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น นำเซลล์มากระจายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.2-0.8 นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์เปียกและค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (ภาคผนวก ก) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

2.5.2 วิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยการใช้การคำนวณจากกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

นำน้ำหมักที่เก็บได้ในแต่ละช่วงเวลามามาปั่นเซลล์ ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น นำเซลล์มากระจายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.2-0.8 นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

2.5.3 การคัดเลือกอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสม เพื่อให้ได้เชื้อที่มีปริมาณมากและมีประสิทธิภาพในการผลิตโคพอลิเมอร์สูงสุด

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 2.4.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร (2 เปอร์เซ็นต์ ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ที่เติมฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาณ 5 10 และ 15 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30° ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง นำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเติบโต แล้วคัดเลือกอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมในการเตรียมกล้าเชื้อเพื่อให้ได้เชื้อปริมาณมากและแอคติวีตีในการผลิตสูง

2.5.4 การคัดเลือกอายุกล้าเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตโคพอลิเมอร์สูงสุด

เลือกอายุกล้าเชื้อที่ศึกษาได้จากข้อ 2.5.3 โดยการคัดเลือกอายุกล้าเชื้อในช่วงระหว่าง log phase ถึง stationary phase ใส่ลงในอาหารเพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ (MSM) ซึ่งมีกรดโพรพิโอนิก 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยการใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.11 กรัมต่อปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30° ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่ประกอบในโคพอลิเมอร์

2.5.5การเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อเพื่อเพิ่มการสร้างและสะสมโคพอลิเมอร์ เมื่อใช้กรดอินทรีย์หรือเกลือของกรดอินทรีย์ชนิดที่เหมาะสมเป็นแหล่งคาร์บอน

นำกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.5.3 และ 2.5.4 ถ่ายลงในอาหาร MSM ที่มีการเติมกรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอน แปรผันปริมาณของน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.07 0.11 0.14 0.18 0.21 และ 0.25 กรัมต่อปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30° ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างตามเวลาที่ได้ศึกษาจากข้อ 2.7 นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เลือกปริมาณกล้าเชื้อเหมาะสมที่ให้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุด

2.6. การศึกษาชนิดของกรดอินทรีย์และเกลือของกรดอินทรีย์ที่เหมาะสม เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์ โดย *Bacillus* sp.BA-019

นำกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.5.4 และ 2.5.5 ถ่ายลงในอาหาร MSM ที่มีการเติมกรดอินทรีย์ได้แก่ กรดโพรพิโอนิก กรดวาเลอริก กรดบิวทิริก กรดอะซิติก กรดซอร์บิก กรดกลูโคนิก กรดแลคติก และกรดซัคซินิก เกลือของกรดอินทรีย์ ได้แก่ โซเดียมอะซีเตท โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต และโซเดียมซัคซิเนต เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30° ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่าง มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ คัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงและน้ำหนักเซลล์แห้งสูง เพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับขั้นตอนการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) จาก *Bacillus* sp.BA-019 ต่อไป

2.7. การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสร้างและสะสมโคพอลิเมอร์

นำกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.5.5 ถ่ายลงในอาหาร MSM ที่มีการเติมกรดอินทรีย์หรือเกลือของกรดอินทรีย์ชนิดที่ได้ทำการศึกษาจากข้อ 2.6 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30° ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ คัดเลือกเวลาที่เหมาะสมในการผลิตโคพอลิเมอร์สูงสุด

2.8.การศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนผสม เพื่อการสร้างโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV ที่มีปริมาณและสัดส่วนของโมโนเมอร์ต่าง ๆ

2.8.1ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนผสมที่เป็นกรดอินทรีย์และน้ำตาล ในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน และให้มีความเข้มข้นรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ได้แก่

น้ำตาลทรายขาวและกรดโพรพิโอนิก

น้ำตาลทรายขาวและกรดบิวทิริก

น้ำตาลทรายขาวและกรดวาเลอริก

กลูโคสและกรดโพรพิโอนิก

กลูโคสและกรดบิวทิริก

กลูโคสและกรดวาเลอริก

ฟรุกโตสและกรดโพรพิโอนิก

ฟรุกโตสและกรดบิวทิริก

ฟรุกโตสและกรดวาเลอริก

น้ำตาลทรายแดงและกรดโพรพิโอนิก

น้ำตาลทรายแดงและกรดบิวทิริก

น้ำตาลทรายแดงและกรดวาเลอริก

2.8.2 ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนผสมที่เป็นกรดอินทรีย์ 2 ชนิด ในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน และให้มีความเข้มข้นรวมเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร ได้แก่

กรดบิวทิริก และกรดโพรพิโอนิก

กรดวาเลอริก และกรดโพรพิโอนิก

กรดวาเลอริก และกรดบิวทิริก

2.8.3 ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนผสมที่เป็นกรดอินทรีย์และกากน้ำตาล ในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน และให้มีความเข้มข้นรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ได้แก่

กากน้ำตาลกรดและโพรพิโอนิก

กากน้ำตาลและกรดบิวทิริก

กากน้ำตาลและกรดวาเลอริก

โดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30° ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำมาตรวจหาการเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่ประกอบในโคพอลิเมอร์ คัดเลือกชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนผสมที่เหมาะสมในการผลิตโคพอลิเมอร์สูงสุด

2.9 การศึกษาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมเพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์สูงสุด

จากผลการวิจัยของรัตนศิริ มุฑิตากุล (รัตนศิริ มุฑิตากุล , 2538) ได้ศึกษาการเปรียบเทียบการผลิต PHA จาก *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ $(NH_4)_2SO_4$ NH_4Cl NH_4NO_3 พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ $(NH_4)_2SO_4$ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ $(NH_4)_2SO_4$ โดยแปรผันความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดที่ได้ศึกษาจากข้อ 2.8 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30° ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำมาศึกษาการเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ สัดส่วนของโมโนเมอร์ และปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมัก

2.10.การศึกษาอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตโคพอลิเมอร์

โดยการใช้ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่ได้จากการศึกษาในข้อ 2.8 และปริมาณแหล่งไนโตรเจน ซึ่งได้แก่ $(NH_4)_2SO_4$ จากข้อ 2.9 มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ศึกษาเท่ากับ 75 150 225 300 และ 375 โมลต่อโมล เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30° ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาศึกษาหาการเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์

2.11.การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่งในน้ำหมัก

โดยวิธีของ Bernfeld (1955) นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสมเพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรอยู่ในช่วง 0.2 - 0.8 จากนั้นใช้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid ; DNSA ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างฟรุกโตสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

2.12. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของโคพอลิเมอร์ ปริมาณกรดอินทรีย์โดยวิธีก๊าซโครมาโตรกราฟี

ตามวิธีของ Comeau และคณะ (1988) โดยทำการปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์มากระจายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เทใส่ขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร นำไประเหิดแห้งภายใต้สุญญากาศ ชั่งเซลล์แห้งน้ำหนัก 20 มิลลิกรัม ใส่หลอดฝาเกลียว เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร เติมเมธานอล 2 มิลลิลิตร (ที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายในปริมาณ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นำไปให้ความร้อนที่ 80° ซ นาน 3.5 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงนาน 5 นาที และปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บชั้นคลอโรฟอร์ม(ชั้นล่าง) ซึ่งมีอนุพันธ์เมทธิลเอสเทอร์ของโมโนเมอร์ไปสกัดแยกกรดและกากเซลล์ด้วยน้ำซ้ำตามวิธีที่กล่าวมาแล้วอีก 2 ครั้ง ถ่ายชั้นคลอโรฟอร์มใส่ในหลอดฝาเกลียวขนาด 2 มิลลิลิตร ระเหยคลอโรฟอร์มออกให้หมด เติมไอโซออกเทน 1 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ที่เหลือ ซึ่งใช้วิธีเดียวกันที่กล่าวข้างต้น แล้วนำมาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของโคพอลิเมอร์โดยวิธีก๊าซโครมาโตรกราฟี ภายใต้สภาวะดังนี้

ชนิดของ column	:	แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด cabowax-PEG ขนาด 60 m. x 25 mm. ID x 25 μm. df
อุณหภูมิของ injector	:	250° ซ (isothermal)
อุณหภูมิของ column	:	130 ° ซ นาน 6 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 180 ° ซ ด้วยอัตรา 5 ° ซ ต่อนาที รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 180 ° ซ
อุณหภูมิของ detector (FID)	:	250° ซ (isothermal)
split ratio	:	50 ต่อ 1
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	:	ไนโตรเจน (อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที)
ปริมาตรฉีด	:	1 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์ชนิดของโมโนเมอร์โดยการเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของสารตัวอย่างกับเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารมาตรฐาน PHB และ P(3HB-co-24%3HV) (ภาคผนวก ค)

การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ของ 3HB และ 3HV (กรัมต่อลิตรต่อ lyophillized cell 20 มิลลิกรัม) โดยใช้โปรแกรม Star chromatogram : Version 4.02 ซึ่งจะทำการคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ (มีกรดเบนโซอิก 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นสารมาตรฐานภายใน) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่วิเคราะห์ในสภาวะเดียวกัน

2.13.การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก

ตามวิธีของ Kemper (1974)โดยนำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำน้ำหมักที่เจือจางแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ (ภาคผนวก ก) ความเข้มข้น 5 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย EDTA (ภาคผนวก ก) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอลไนโตรพัสไซด์ (ภาคผนวก ก) 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัพเฟอร์ไฮโปคลอไรด์ (ภาคผนวก ก) 4 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดประจุ 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 40 °ซ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจน (NH_4^+-N) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ข)

2.14 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลในกากน้ำตาลด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตรกราฟี (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)

เตรียมกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำมาปั่นที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เพื่อกำจัดสารแขวนลอยที่ปนเปื้อนในกากน้ำตาลออกแล้วจึงนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน นำส่วนที่กรองได้ฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีก (peak area) ของน้ำตาลแต่ละชนิดกับน้ำตาลมาตรฐานแต่ละชนิด (ภาคผนวก ค) ในภาคผนวกได้แสดงโครมาโตแกรมของน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด จากกากน้ำตาลที่เปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และ ซูโครสมาตรฐาน สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์มีดังนี้ (ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

column	:	phenomenax spherisorb NH_2
detector	:	refactive index detector
flow rate	:	2 มิลลิลิตรต่อนาที
mobile phase	:	75% อะซิโตไนไตรล์
ปริมาตรฉีด	:	20 ไมโครลิตร

2.15 การสกัดโคพอลิเมอร์และการทำให้บริสุทธิ์

ใช้วิธีของ Doi และคณะ (1995) โดยปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง รวบรวมเซลล์ทั้งหมดไประเหิดแห้งภาย

ใต้สุญญากาศ นำเซลล์บรรจุในถุงกระดาษกรองเบอร์ 2 นำไปสกัดโคพอลิเมอร์ด้วยคลอโรฟอร์มในชุดสกัด Soxhlet apparatus ที่อุณหภูมิ 60 °ซ นาน 36 ชั่วโมง นำไประเหยคลอโรฟอร์มในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 70 °ซ แล้วนำพอลิเมอร์ละลายในคลอโรฟอร์มและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีตกตะกอนอย่างช้า ๆ ด้วยเฮกเซนปริมาตร 5 เท่า ทำซ้ำ 4 ครั้ง แล้วนำมาอบให้แห้ง

2.16 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพบางประการของโคพอลิเมอร์

2.16.1การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลตัวอย่างโคพอลิเมอร์ โดยเครื่อง Gel Permeation Chromatography (GPC) โดยวิธีของ Abate และคณะ (1995) ละลายผงโคพอลิเมอร์ด้วยคลอโรฟอร์มเกรด HPLC เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน นำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography ที่มีสภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้

detector	:	Differential Refractometry (RI)
column	:	Ultrastyragel Linear 10 μm 2 ชุด ต่อด้วย HT10 ^{3}A°
อุณหภูมิ	:	อุณหภูมิ 35 °ซ
สารละลายตัวพา	:	คลอโรฟอร์มเกรด HPLC
อัตราการชะ	:	1 มิลลิลิตร
ปริมาตรการฉีด	:	100 ไมโครลิตร

คำนวณน้ำหนักโมเลกุลของโคพอลิเมอร์ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของพอลิสไตรีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง $4.18 \times 10^2 - 2.06 \times 10^7$ ซึ่งวิเคราะห์ที่สภาวะเดียวกัน (ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่กรมวิทยาศาสตร์บริการ)

2.16.2 การวิเคราะห์หาอุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature , Tm) ค่าความร้อนการหลอมละลาย (heat of fusion, Δh_f) และ อุณหภูมิกลาสทรานซิชั่น (glass transition temperature, Tg) ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) ตามวิธีของ Abe และDoi (1995) ทำโดยชั่งน้ำหนักแผ่นโคพอลิเมอร์ 10 มิลลิกรัม ใส่ในถ้วยอะลูมิเนียมขนาดปริมาตร 30 ไมโครลิตร ซึ่งทำการวิเคราะห์ 2 ขั้นตอน ภายใต้สภาวะดังนี้

1 หาค่า Tm และค่า Δh_f โดยเพิ่มอุณหภูมิจาก 0° ซ ถึง 200 °ซ ด้วยอัตรา 10 °ซ ต่อนาที

2 ทำการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วจาก 200 °ซ ถึง -150 °ซ แล้ววิเคราะห์หาค่า Tg

ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิจาก -150 ° ซ ถึง 200 ° ซ ด้วยอัตรา 20 ° ซ ต่อนาที (ได้ทำการวิเคราะห์โดยใช้อุปกรณ์ที่ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ)

2.16.3 การเปรียบเทียบระดับความเป็นผลึก(degree of crystallity) ของแผ่นฟิล์มที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง X-Ray powder Diffractometer (XRD) ใช้วิธีของ Bluhm และคณะ (1996) นำแผ่นฟิล์มที่มีความหนาไม่ต่ำกว่า 0.05 มิลลิเมตร วางบนแผ่นสไลด์ห่างจากขอบ 1.5 เซนติเมตร ทำการวิเคราะห์โดยใช้ nickel filtrated Cu Kα เป็นแหล่งกำเนิด radiation ($\lambda = 0.1542$ $2\theta = 4$-80 40kV 30 mA) (ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)