บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

3.1.1 อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
กล้องจุลทรรศน์ รุ่น Labophot II	Nikon ประเทศญี่ปุ่น
อุปกรณ์ถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ รุ่น AFX-DX	Nikon ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (gas chromatography) รุ่น 3400CX	Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องสำหรับฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ (auto sampler) รุ่น 8200CX	Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา
แคปพิลลารีคอลัมน์ (capillary column) ชนิด carbowax-PEG เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มม. ความยาว 60 ม.	Restex ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องผลิตก๊าซไฮโดรเจน (hydrogen generator) รุ่น 9200	Pachard ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องผลิตก๊าซออกซิเจน (air compressor) รุ่น WL 505000 AJ	Campbell Hausfeld ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psychotherm incubator shaker) รุ่น G27 แบบหมุน (rotary)	New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น A200S	Sartorius ประเทศเยอรมัน
เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น L2200P	Sartorius ประเทศเยอรมัน
เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KS-3000P	Kubota ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ รุ่น Centrikon T-42K	Kontron ประเทศอิตาลี
เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ รุ่น J2-21	Beckman ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องระเหิดแห้ง (Lyophillizer) รุ่น Eyela FD-1	Tokyo Rikakikai ประเทศญี่ปุ่น

3.1.1 อุปกรณ์ (ต่อ)

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (VIS spectrophotometer) รุ่น Novaspec II	Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น 2000	Cyberscan ประเทศสิงคโปร์
ชุดสกัดสาร (soxhlet apparatus) ขนาด 1000 มิลลิลิตร	Brand ประเทศเยอรมัน
ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124	ISSCO ประเทศสหรัฐอเมริกา
ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น BM 800	Memmert ประเทศเยอรมัน
ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UL60	Memmert ประเทศเยอรมัน
ตู้อบแห้ง (dryer oven) รุ่น UL80	Memmert ประเทศเยอรมัน
หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325	Tomy ประเทศญี่ปุ่น
อ่างน้ำเดือด (water bath) รุ่น W70	Memmert ประเทศเยอรมัน
อุปกรณ์หล่อเย็น (circulation cooler)	Marubishi ประเทศญี่ปุ่น

3.1.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1,4-บิวเทนไดออล [$C_4H_{10}O_2$]	Aldrich Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดซัลฟูริกเข้มข้น [H_2SO_4]	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
กรดเบนโซอิก [$C_7H_6O_2$]	Nacalai Tesque ประเทศญี่ปุ่น
กรดวาเลอริก [$C_5H_{10}O_2$]	Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
กากน้ำตาล (molasses)	ไทยเมจิฟาร์มาซูติคัล ประเทศไทย
คลอโรฟอร์ม [CH_3Cl]	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
คลอโรฟอร์มเกรด HPLC	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
ไดคลอโรมีเทนเกรด HPLC	J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
ไอโซออกเทน	J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
อะซีโตน	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
เอทธานอล	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
เมทธานอล	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
เฮกเซน	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
พอลิ(บีต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) , PHB	Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ($C_4H_7O_3Na$)	Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-12% 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) P(3HB-co-12%3HV)	Aldrich chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($Na_2HPO_4.2H_2O$)	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	Calo Erba ประเทศอิตาลี
แอมโมเนียมโมลิบเตรเตตระไฮเดรต [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$)]	J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	Calo Erba ประเทศอิตาลี
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตระไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	May & Baker ประเทศอังกฤษ
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
กรดบอริก (H_3BO_3)	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตระไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)	Calo Erba ประเทศอิตาลี
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)	J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2.2H_2O$)	Carlo Erba ประเทศอิตาลี
ซูโครส (น้ำตาลทราย)	มิตรผล ประเทศไทย
ซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
โซเดียมโพรพิโอเนต ($C_3H_5O_2Na$)	Fluka ประเทศเยอรมัน
โซเดียมวาเลอริก ($C_5H_9O_2Na$)	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
แกมมา-บิวทิโรแลกโตน	Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
พอลิเปปโตน (polypeptone)	Becton Dickinson ประเทศสหรัฐอเมริกา
สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	Deutsche Hefewerke Gmbh & Co.
เอนไซม์อินเวอร์เทส (grade V EC3.2.1.26)	Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ คือ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BA-019 ซึ่งแยกและคัดเลือกโดย รัตนศิริ มุทิตากุล (2538)

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ คือ อาหารนิวเตรียนท์ (nutrient agar) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

พอลิเปปโตน	5	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที ซึ่งเป็นภาวะมาตรฐาน

3.3.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed culture medium) ใช้สูตรของ Doi และคณะ(1986) ซึ่งศึกษาโดย รัตนศิริ มุทิตากุล (2538) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

ซูโครส	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	10	กรัม
พอลิเปปโตน	5	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	5	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.2 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน ส่วนน้ำตาลแยกละลายและนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

3.3.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตพอลิเมอร์ คืออาหาร MSM (Mineral Salt Medium) ซึ่งปรับปรุงโดย สุดา สุภาชวินสวัสดิ์ (2542) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

แอมโมเนียมซัลเฟต	1.0	กรัม
โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	3.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.1	กรัม
สารละลาย trace element	1.0	มิลลิลิตร

แยกละลายเกลือแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตและ trace element เมื่อละลายแล้วจึงนำมารวมกัน ปรับ pH ที่เหมาะสม และนึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน

สารละลาย trace element สูตรเดิมใน 1 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริก 1 ลิตร ประกอบด้วย

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

3.4 วิธีการเก็บรักษาเชื้อและเตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

3.4.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) สำหรับเก็บรักษาเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาเขี่ยลากเชื้อลงบนอาหารใหม่ (sub culture) ทุก 3 เดือน

3.4.2 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

นำเชื้อที่เก็บรักษาไว้มาเขี่ยลากเชื้อลงบนอาหารใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเติบโตดีแล้วถ่ายเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ กระจายเชื้อ (resuspend) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5

3.5 ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์แต่ละชนิด ในการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) จาก *Bacillus* sp. BA-019

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (Doi และคณะ, 1986) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงอาหารเหลวสำหรับการผลิตพอลิเมอร์ ซึ่งได้แก่ Mineral Salt Medium ที่ปรับปรุงโดย สุดา สุภาชวินสวัสดิ์ (2542) ปริมาตร 75 มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.5.1 สารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการสร้างโมโนเมอร์ 3HB ในเทอร์พอลิเมอร์

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงอาหารเหลวสำหรับการผลิตพอลิเมอร์ โดยเปรียบเทียบชนิดของสารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการสร้างโมโนเมอร์ 3HB ได้แก่ ซูโครส น้ำตาลทราย หรือ กากน้ำตาล อย่างใดอย่างหนึ่ง ซึ่งคิดเป็นปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร สารตั้งต้นสำหรับโมโนเมอร์ 3HV ได้แก่ เกลือวาเลอเรต ความเข้มข้นเท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์ และ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ความเข้มข้นเท่ากับ 25 มิลลิโมลาร์ เป็นสารตั้งต้นสำหรับโมโนเมอร์ 4HB ดังนี้

- อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย ซูโครส 15 กรัมต่อลิตร เกลือวาเลอเรต 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 25 มิลลิโมลาร์
- อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร เกลือวาเลอเรต 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 25 มิลลิโมลาร์
- อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย กากน้ำตาล 15 กรัมต่อลิตร เกลือวาเลอเรต 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 25 มิลลิโมลาร์

เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เพื่อเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมเพื่อเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสร้างโมโนเมอร์ 3HB

3.5.2 สารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการสร้างโมโนเมอร์ 3HV ในเทอร์พอลิเมอร์

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงอาหารเหลวสำหรับการผลิตพอลิเมอร์ โดยใช้สารตั้งต้นสำหรับ 3HB ที่ได้จากข้อ 3.5.1 และใช้สารตั้งต้นสำหรับสร้าง 4HB เป็น โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ความเข้มข้นเท่ากับ 25 มิลลิโมลาร์ เพื่อเปรียบเทียบชนิดของสารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการสร้าง 3HV ได้แก่ เกลือวาเลอเรต หรือเกลือโพรพิโอเนต อย่างใดอย่างหนึ่ง ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ดังนี้

. อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร เกลือวาเลอเรต 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 25 มิลลิโมลาร์

. อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร เกลือโพรพิโอเนต 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 25 มิลลิโมลาร์

เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เพื่อคัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมเพื่อเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสร้างโมโนเมอร์ 3HV

3.5.3 สารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการสร้าง โมโนเมอร์ 4HB ในเทอร์พอลิเมอร์

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในอยู่ขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงอาหารเหลวสำหรับการผลิตพอลิเมอร์ โดยใช้สารตั้งต้นสำหรับ 3HB ที่ศึกษาจากข้อ 3.5.1 และสารตั้งต้นสำหรับผลิต 3HV ที่ศึกษาจากข้อ 3.5.2 และเปรียบเทียบชนิดของสารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิต 4HB ได้แก่ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 1,4-บิวเทนไดออล หรือ แกมมา-บิวทิวโรแลคโตน อย่างใดอย่างหนึ่ง ความเข้มข้นเท่ากับ 25 มิลลิโมลาร์ ดังนี้

ก. อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร เกลือโพรพิโอเนต 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 25 มิลลิโมลาร์

ข. อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร เกลือโพรพิโอเนต 50 มิลลิโมลาร์ 1,4- บิวเทนไดออล 25 มิลลิโมลาร์

ค. อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร เกลือโพรพิโอเนต 50 มิลลิโมลาร์ แกมมา-บิวทิวโรแลกโทน 25 มิลลิโมลาร์

เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เพื่อเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม เพื่อเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสร้างโมโนเมอร์ 4HB

3.6 ศึกษาสารตั้งต้นแต่ละชนิด โดยแปรความเข้มข้นเพื่อผลิตเทอร์พอลิเมอร์จาก *Bacillus* sp. BA-019 ให้มีสัดส่วนโดยโมลของโมโนเมอร์แต่ละชนิด (3HB 3HV และ 4HB) ต่างๆ กัน

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงอาหารเหลวสำหรับการผลิตพอลิเมอร์ โดยแปรความเข้มข้นของสารตั้งต้นแต่ละชนิด ได้แก่ น้ำตาลทรายที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.5.1 คิดเป็นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 0 5 10 และ 15 กรัมต่อลิตร สารตั้งต้นของ 3HV ที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.5.2 ปริมาณเท่ากับ 25 50 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ และสารตั้งต้นของ 4HB ที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.5.3 ปริมาณเท่ากับ 15 25 50 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เพื่อศึกษาความเข้มข้นของสารตั้งต้นแต่ละชนิดและสัดส่วนของเทอร์พอลิเมอร์ที่ผลิตได้ แล้วนำเทอร์พอลิเมอร์ซึ่งมีสัดส่วนของโมโนเมอร์แตกต่าง กันไปวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเชิงกล

3.7 ศึกษาการผลิตเทอร์พอลิเมอร์จาก *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แกมมา-บิวทิโรแลก-โตน เป็นสารตั้งต้นสำหรับโมโนเมอร์ 4HB เพื่อลดต้นทุนการผลิต ด้วยการเลี้ยงเชื้อแบบสองขั้นตอน

การใช้แกมมา- บิวทิโรแลกโตน เป็นสารตั้งต้นสำหรับ 4HB แทนโซเดียม 4-ไฮดรอกซี-บิวทิเรต ทั้งนี้เนื่องจาก แกมมา-บิวทิโรแลกโตน มีราคาถูกกว่ามาก แต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของแบคทีเรีย จึงศึกษาการเลี้ยงเชื้อแบบสองขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกเลี้ยงเชื้อให้ได้ปริมาณเซลล์มาก แล้วจึงเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตพอลิเมอร์ โดยเลี้ยงกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์จากอาหารเหลวด้วยความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องปั่นแยกที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นถ่ายลงอาหารเหลวสำหรับการผลิตพอลิเมอร์ โดยเปรียบเทียบเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1.70 และ 3.40 กรัมต่อลิตร แหล่งคาร์บอนที่นำมาศึกษา คือ น้ำตาลทราย เพื่อเป็นสารตั้งต้นสำหรับ 3HB

สารตั้งต้นสำหรับ 3HV ใช้เกลือโพรพิโอเนต และสารตั้งต้นสำหรับ 4HB คือ แกมมา-บิวทิ-โรแลกโตน ความเข้มข้นของสารตั้งต้นมีดังนี้

น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร เกลือโพรพิโอเนต 50 มิลลิโมลาร์ แกมมา-บิวทิโร-แลกโตน 25 มิลลิโมลาร์

เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์

3.8 การวิเคราะห์

3.8.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำเซลล์ที่แยกได้จากการปั่นน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม อบเซลล์ที่ผ่านการปั่นล้างแล้วในถ้วยอลูมิเนียมที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 18 – 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักถ้วย คำนวณหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.8.2 การวิเคราะห์สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณของเทอร์พอลิ-เมอร์โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟฟี (Gas Chromatography : GC)

ตามวิธีของ Comeau และคณะ (1988) ซึ่งมีวิธีการดังนี้ แยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก โดยปั่นที่ 3000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์มากระจายในน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร เทใส่ขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร นำไประเหิดแห้งภายใต้สูญญากาศ ชั่งเซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัม ใส่หลอดฝาเกลียว เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร เติมเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 3 (3% acidified methanol) 2 มิลลิลิตร ที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3.5 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงนาน 5 นาทีและปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บชั้นคลอโรฟอร์ม ซึ่งมีอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ของโมโนเมอร์ ไปสกัดแยกกรดและกากเซลล์ด้วยน้ำกลั่นตามวิธีข้างต้นอีกครั้ง แต่เติมน้ำกลั่นเพียง 0.5 มิลลิลิตร ถ่ายชั้น

คลอโรฟอร์มใส่หลอดฝาเกลียวสำหรับวิเคราะห์ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟฟี แล้ววิเคราะห์สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณของเทอร์พอลิเมอร์โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟฟี ภายใต้ภาวะดังนี้

ชนิดของ Column	:	แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด cabowax-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)
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	:	ก๊าซไนโตรเจนอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	:	1 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์ชนิดของโมโนเมอร์ โดยการเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของสารตัวอย่างกับเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารละลายมาตรฐาน PHB และ P(3HB-co-12%3HV) และ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (ภาคผนวก ง) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

การแสดงปริมาณเทอร์พอลิเมอร์นิยมแสดงเป็นปริมาณต่อปริมาตรของอาหารที่ใช้เลี้ยง (กรัมต่อลิตร) หรือแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของปริมาณผลิตภัณฑ์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ของ 3HB 3HV และ 4HB (กรัมต่อลิตรต่อ lyophilized cell 20 มิลลิกรัม) โดยใช้โปรแกรม Star chromatogram:version 4.02 ซึ่งทำการคำนวณปริมาณมาตรฐานที่นำมาวิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน แสดงโครมาโตแกรมและกราฟมาตรฐานของสารต่างๆ ใน ภาคผนวก ง

3.8.3 การวิเคราะห์หาปริมาณของโพรพิโอเนต และวาเลอเรตโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟฟี

ใช้วิธีของ Ramsay และคณะ (1990) โดยนำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดฝาเกลียว เติมเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 3 (3% acidified methanol) 2 มิลลิลิตรที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นและไดคลอโรมีเทนอย่างละ 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงนาน 5 นาทีและปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บชั้นไดคลอโรมีเทน (ชั้นล่าง) ซึ่งมีอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ของโมโนเมอร์ ใส่หลอดฝาเกลียวสำหรับ

วิเคราะห์ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟฟี แล้ววิเคราะห์ปริมาณโพรพิโอเนตและวาเลอเรตโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟฟี ภายใต้ภาวะดังนี้

ชนิดของ column	:	แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด cabowax-PEG เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 60 เมตร
อุณหภูมิของ injector	:	250 องศาเซลเซียส (isothermal)
อุณหภูมิของ column	:	130 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 180 องศาเซลเซียสด้วยอัตรา15องศาเซลเซียสต่อนาที รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 180 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที
อุณหภูมิของ detector (FID)	:	250 องศาเซลเซียส (isothermal)
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	:	ก๊าซไนโตรเจนอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	:	1 ไมโครลิตร

การคำนวณปริมาณโพรพิโอเนตและวาเลอเรตโดยใช้โปรแกรม Star chromatogram : version 4.02 ซึ่งจะทำการคำนวณปริมาณโมโนเมอร์โดยมีสารมาตรฐานภายในเป็นกรดเบนโซอิก 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน

3.8.4 การหาปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจนในน้ำหมัก

ใช้วิธีของ Kemper (1974) โดยนำน้ำหมักที่ทำการปั่นแยกเซลล์ออกแล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 20 x 150 มิลลิเมตร เติมโพแตสเซียมคลอไรด์ (ภาคผนวก ก) ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลาย EDTA (ภาคผนวก ก) 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้นาน 1 นาที จากนั้นเติมฟีนอลไนโตรพัสซายด์รีเอเจนต์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรท์รีเอเจนต์ (ภาคผนวก ก) 4 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจน และค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร (ภาคผนวก ง) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.8.5 การหาปริมาณซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้เอนไซม์อินเวอร์เตส (invertase) โดยนำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์แล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เตส 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 4.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธีของ Bernfeld (1955) ต่อโดยเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid หรือ DNSA reagent) ภาคผนวก ก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างซูโครสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (ภาคผนวก ง) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.9 การสกัดเทอร์พอลิเมอร์และการทำให้บริสุทธิ์

ใช้วิธีของ Doi และคณะ(1995) โดยทำการปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก โดยปั่นที่ 8000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์ทั้งหมดไประเหิดแห้งภายใต้สุญญากาศ บรรจุเซลล์ระเหิดแห้งลงในถุงกระดาษกรองเบอร์ 2 เย็บปิดด้วยด้ายทุกด้านให้สนิทนำไปใส่ในส่วน extraction ของเครื่อง Soxhlet apparatus สกัดเทอร์พอลิเมอร์ด้วยคลอโรฟอร์มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง นำไประเหยคลอโรฟอร์มในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แช่แผ่นฟิล์มด้วยเฮกเซนปริมาตร 4 เท่านาน 24 ชั่วโมง นำแผ่นเทอร์พอลิเมอร์ที่ได้แห้งเก็บรักษาในเดซิเคเตอร์

3.10 การเตรียมแผ่นฟิล์มสำหรับทดสอบสมบัติเชิงกลและสมบัติทางกายภาพ

ใช้วิธีของ Yoshie และคณะ (1995) โดยละลายเทอร์พอลิเมอร์ด้วยคลอโรฟอร์มให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เตรียมแผ่นฟิล์มโดยวิธีการเทสารละลายเทอร์พอลิเมอร์ลงในแม่พิมพ์ ที่ปรับระดับให้เท่ากันทุกด้าน ปริมาตรของสารละลายเทอร์พอลิเมอร์ขึ้นอยู่กับขนาดของแม่พิมพ์ โดยควรให้ได้แผ่นฟิล์มหนาประมาณ 0.050 มิลลิเมตร (ไม่ควรหนาต่ำกว่า 0.025 มิลลิเมตร) ทิ้งให้คลอโรฟอร์มระเหยในตู้ควันที่อุณหภูมิห้อง นำไปอบแห้งในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้แผ่นฟิล์มตกผลึกที่อุณหภูมิห้องนาน 12

ชั่วโมง แกะออกจากแม่พิมพ์ ก่อนนำแผ่นฟิล์มไปทำการทดสอบจะต้องมีการตกผลึกอย่างสมบูรณ์ เป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 7 วัน

3.11 การหาสมบัติทางกายภาพ และเชิงกลของเทอร์พอลิเมอร์

3.11.1 การวิเคราะห์อุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature, T_m) และอุณหภูมิกลาสทรานซิชัน (glass transition temperature, T_g) โดยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC)

ใช้วิธีของ Shi และคณะ (1996) โดยชั่งเทอร์พอลิเมอร์ให้มีน้ำหนักเท่ากับ 5 – 10 มิลลิกรัมต่อชิ้น ใส่ในถ้วยอะลูมิเนียม (aluminium curcible) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ทำการวิเคราะห์ภายใต้สภาวะไนโตรเจน โดยทำการวิเคราะห์เป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

1. หาค่าอุณหภูมิหลอมเหลวและค่าความร้อนของการหลอมเหลวโดยเพิ่มอุณหภูมิจาก 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที
2. ลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วจาก 180 องศาเซลเซียส ถึง – 80 องศาเซลเซียส แล้ววิเคราะห์หาค่า T_g โดยเพิ่มอุณหภูมิจาก – 80 องศาเซลเซียส ถึง 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียส ต่อนาที ภายใต้สภาวะไนโตรเจน

โดยมีสารมาตรฐานเปรียบเทียบคือ Al_2O_3 (ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

3.11.2 การทดสอบสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มโดยเครื่อง Universal testing machine

วิเคราะห์สมบัติเชิงกล โดยเครื่อง universal testing machine โดยเตรียมตัวอย่างตามวิธีมาตรฐานของ JIS วิเคราะห์ค่าการต้านแรงดึง (tensile strength) ค่าการยืดจนขาด (elongation to break) ค่า Young's modulus แสดงถึงความแข็งและเปราะ (ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)