บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์ และ เคมีภัณฑ์

1.1 อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psychotherm shaker) รุ่น G-27 แบบ rotary	บริษัท New Brunswick Scientific, USA.
เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KS-3000P	บริษัท Kubota, Japan
เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21	บริษัท Beckman, USA.
เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น L2200P	บริษัท Sartorius, Germany
เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น A200S	บริษัท Sartorius, Germany
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer) รุ่น UV-160	บริษัท Shimadzu, Japan
เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น 240	บริษัท Corning, USA.
ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124	บริษัท ISSCO, USA.
ตู้อบแห้ง (hot air oven) รุ่น UL 60	บริษัท Memmert, Germany
หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA-36	บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) บริษัท Memert, Germany
รุ่น W 760

เครื่องให้ความร้อน (stirring hot plate) บริษัท DMS, Japan
รุ่น DS 201HS

เครื่องระเหิดแห้งระบบสุญญากาศ (lyophillizer) บริษัท Tokyo Rikakikai, Japan
รุ่น Eyela FD-1

เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography) บริษัท Varian, USA.
รุ่น 3400 C

เครื่องสำหรับฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ (auto sampler) บริษัท Varian,USA.
รุ่น 8200CX

แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด cabowax-PEG บริษัท Restex, USA.
ขนาด 60 m.× 25 mm. ID × 25 μm. df

เครื่องผลิตก๊าซไฮโดรเจน (hydrogen generator) บริษัท Packard, USA.
รุ่น 9200

เครื่องผลิตก๊าซออกซิเจน (air compressor) บริษัท Campbell Hausfeld, USA.
รุ่น WL 505000AJ

เครื่อง Gel Permeation Chromatography (GPC) บริษัท Waters, USA.
รุ่น 600E

คอลัมน์ชนิด Ultrastyragel บริษัท Waters, USA.
ขนาด 10^5 Å และ 10^4 Å

เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) บริษัท NETZSCH, Germany
รุ่น DSC 2000

crucible pan และ cover บริษัท NETZSCH, Germany
รุ่น 100 DSC (Al 25 μl)

เครื่องมือวัดความหนาของแผ่นฟิล์ม บริษัท Mitutoyo, Japan
รุ่น 7301

เครื่อง Universal testing machine บริษัท Instron, USA.
รุ่น 5583

เครื่อง X-Ray powder diffractometer บริษัท Phillips, Holland
รุ่น PW 1830/0

ปิเปตขนาด 100, 200 และ 1000 µl	บริษัท Gilson, France
เครื่องมือวัดระดับพื้นที่	บริษัท Magnet, Germany
ชุด soxhlet apparatus ขนาด 1,000 มิลลิลิตร	บริษัท Brand GMBH, Germany
เครื่องอุปกรณ์หล่อเย็น (circulation Cooler)	บริษัท Marubishi, Japan

1.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
กรดวาเลอริก ($C_5H_{10}O_2$)	บริษัท Sigma Chemical, USA.
กรดบิวทิริก ($C_4H_8O_2$)	บริษัท E.Merck Domstadt, Germany
ฟรักโทส	บริษัท E.Merck Domstadt, Germany
1,4-บิวเทนไดออล [$HO(CH_2)_4OH$]	บริษัท Aldrich chemical, USA.
พอลิ(บีต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) , PHB	บริษัท Sigma Chemical, USA.
โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ($C_4H_7O_3Na$)	บริษัท Sigma Chemical, USA.
พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-20% 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) P(3HB-co-20%3HV)	บริษัท Aldrich Chemical, USA.
สารมาตรฐานพอลิสไตรีนน้ำหนักโมเลกุล 9.1×10^3	บริษัท Tosoh, Japan
สารมาตรฐานพอลิสไตรีนน้ำหนักโมเลกุล 1.81×10^4	บริษัท Tosoh, Japan
สารมาตรฐานพอลิสไตรีนน้ำหนักโมเลกุล 3.79×10^4	บริษัท Tosoh, Japan
สารมาตรฐานพอลิสไตรีนน้ำหนักโมเลกุล 9.64×10^4	บริษัท Tosoh, Japan
สารมาตรฐานพอลิสไตรีนน้ำหนักโมเลกุล 1.90×10^5	บริษัท Tosoh, Japan
สารมาตรฐานพอลิสไตรีนน้ำหนักโมเลกุล 3.55×10^5	บริษัท Tosoh, Japan
สารมาตรฐานพอลิสไตรีนน้ำหนักโมเลกุล 7.06×10^5	บริษัท Tosoh, Japan
สารมาตรฐานพอลิสไตรีนน้ำหนักโมเลกุล 1.09×10^5	บริษัท Tosoh, Japan
สารมาตรฐานพอลิสไตรีนน้ำหนักโมเลกุล 2.89×10^6	บริษัท Tosoh, Japan
สารมาตรฐานพอลิสไตรีนน้ำหนักโมเลกุล 3.84×10^6	บริษัท Tosoh, Japan
กรดซัลฟุริกเข้มข้น	บริษัท E Merck Domstadt, Germany
กรดเบนโซอิก ($C_7H_6O_2$)	บริษัท Nacalai tesque, Japan
แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]	บริษัท E. Merk Damstadt, Germany
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต	บริษัท E. Merk Damstadt, Germany

I2340127

($Na_2HPO_4.2H_2O$)	
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	บริษัท E. Merk Damstadt, Germany
($MgSO_4.7H_2O$)	
โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	บริษัท E. Merk Damstadt, Germany
(KH_2PO_4)	
แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต	บริษัท J.T. Baker, USA
[$(NH_4)_6MO_7O_{24}.4H_2O$]	
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	บริษัท Carlo erba, Italy
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	บริษัท E. Merk Damstadt, Germany
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	บริษัท E. Merk Damstadt, Germany
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	บริษัท E. Merk Damstadt, Germany
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตระไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	บริษัท May&Baker, England
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	บริษัท E. Merk Damstadt , Germany
กรดบอริก (H_3PO_3)	บริษัท E. Merk Damstadt, Germany
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตระไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)	บริษัท Carlo erba, Italy
โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl)	บริษัท The Clorox Company, USA.
คลอโรฟอร์มเกรด HPLC	บริษัท J.T. Baker, USA.
คลอโรฟอร์ม	บริษัท J.T. Baker, USA.
ไดคลอโรมีเทนเกรด HPLC	บริษัท E. Merck Damstadt, Germany
ไอโซออกเทน	บริษัท J.T. Baker, USA
อะซีโตน	บริษัท BDH laboratory, England
เอทธานอล	บริษัท BDH laboratory, England
เมทธานอล	บริษัท BDH laboratory, England
เฮกเซน	บริษัท AJAX chemicals, Australia
ถุงเย็นชนิดความหนาแน่นต่ำ (LDPE)	โรงงานยูนิคพลาสติก, ประเทศไทย
ถุงร้อนชนิดขุ่น	หจก. แอลเอ็มอินดัสตรี้, ประเทศไทย
ถุงร้อนชนิดใส	บริษัทดนุเดชเทรดดิ้ง, ประเทศไทย
ถุงหูหิ้วชนิดย่อยสลายด้วยแสงอัลตราไวโอเลต	บริษัทเซ็นทรัล, ประเทศไทย

เคมีภัณฑ์ประเภทอาหารเลี้ยงเชื้อ (media)

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

2. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้คือ *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถสร้างและสะสม พอลิบีต้าไฮดรอกซี-อัลคาโนเอต (PHA) ซึ่งคัดเลือกโดย อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (stock culture medium) ใน 1 ลิตรประกอบด้วย

สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
วุ้นผง	14	กรัม

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

3.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed culture medium) โดย Doi และคณะ (1986) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

ผงสกัดจากยีสต์	10	กรัม
พอลิเปปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

3.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิต PHA

MSM (Mineral Salt Medium) สูตรปรับปรุงโดย อรุณชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536)

ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

แอมโมเนียมซัลเฟต	0.1	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.3	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.05	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	0.1	กรัม
สารละลาย trace element	1	มิลลิลิตร

สารละลาย trace element ใน 1M HCl 1 ลิตรประกอบด้วย

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

แยกละลาย เกลือ , แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต และ trace element เมื่อละลายแล้วจึงนำมารวมกัน ปรับ pH เป็น 7.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3.0 โมลาร์ นึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

4. วิธีการเก็บรักษาเชื้อและการเตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงเป็นกล้าเชื้อ

4.1 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) สำหรับเก็บรักษาเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ นำมาเขี่ยลากเชื้อลงบนอาหารใหม่ (sub culture) ทุกๆ 1 เดือน

4.2 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงเป็นกล้าเชื้อ

นำเชื้อที่เก็บรักษาไว้มาเขี่ยลากเชื้อลงบนอาหารใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเติบโตดีแล้วถ่ายเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ กระจายเชื้อ (resuspend) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.35-0.40

4.3 การคัดเลือกอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมและการปรับปรุงอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ได้เชื้อที่มีปริมาณมากและมีประสิทธิภาพในการผลิตสูงขึ้น

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 4.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (2 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่ทำการแปรผันสัดส่วนกรดวาเลอริกและฟรักโทสให้มีความเข้มข้นรวม 4 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30°ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณฟรักโทสที่เหลือในอาหาร (กรัมต่อลิตร) และปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ (เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและกรัมต่อลิตร) นำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเจริญเติบโต แล้วคัดเลือกอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมในการเตรียมกล้าเชื้อ เพื่อให้ได้เชื้อปริมาณมากและประสิทธิภาพในการผลิตสูง

5. การหาการเจริญเติบโตของ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยหาค่าความเข้มข้นเซลล์ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร วิธีหาน้ำหนักเซลล์เปียกและน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยใช้การคำนวณจากกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์และค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

5.1 วิธีหาน้ำหนักเซลล์เปียก โดยใช้การคำนวณจากกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์เปียกและค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

นำน้ำหมักที่เก็บได้ในแต่ละช่วงเวลามาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.2-0.8 นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์เปียกและค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

5.2 วิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยใช้การคำนวณจากกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืน แสงที่ 600 นาโนเมตร

นำน้ำหมักที่เก็บได้ในแต่ละช่วงเวลามาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.2-0.8 นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

6. การศึกษาหาปริมาณฟรักโทสและแอมโมเนียมที่เหมาะสมในอาหาร MSM เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ (ขั้นตอนที่ 1) ซึ่งเป็นวิธีการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเพื่อการผลิตแบบ 2 ขั้นตอน เพื่อผลิตเทอร์พอลิเมอร์

ถ่ายกล้าเชื้อที่ทำการคัดเลือกอายุในช่วงต่างๆจากข้อ 4.3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (2 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต ทำการแปรผันปริมาณฟรักโทสในช่วง 0-10 กรัมต่อลิตร และปริมาณไนโตรเจนในช่วง 0.1-0.3 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30°ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโทสที่เหลือ เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิต PHB ของกล้าเชื้ออายุเชื้อต่างกันเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อสูตรต่างๆ เพื่อคัดเลือกอายุเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตในอาหาร MSM ได้สูง โดยไม่ต้องใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นปริมาณมากและมีประสิทธิภาพในการผลิตสูงที่สุด หาระยะเวลาที่ฟรักโทสถูกใช้จนหมดก่อนถึงระยะการผลิต เพื่อเติมแหล่งคาร์บอนอื่นสำหรับการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ชนิดต่างๆต่อไป

7. การศึกษาชนิด ปริมาณของแหล่งคาร์บอน และระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 เพื่อผลิตเทอร์พอลิเมอร์

นำกล้าเชื้อที่เตรียมจากข้อ 4.3 น้ำหนักเซลล์เปียกเท่ากับ 0.6 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร โดยใช้กราฟมาตรฐานเปรียบเทียบระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรและน้ำหนักเซลล์เปียก (ภาคผนวก ข) ถ่ายกล้าเชื้อลงในอาหาร MSM ที่ทำการแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ทั้ง 3 ชนิด เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30°ซ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เพื่อคัดเลือกเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเทอร์พอลิเมอร์

8. การทดลองเปลี่ยนชนิดแหล่งคาร์บอน เพื่อลดต้นทุนและเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต

แหล่งคาร์บอนที่ศึกษาในงานวิจัยนี้คือ การเสริมหรือไม่เสริมแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HB โมโนเมอร์ โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้เสริมคือฟรักโทสหรือกรดบิวทิริก และการนำ 1,4-บิวเทนไดออลแทนโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ 4HB โมโนเมอร์ แหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HV โมโนเมอร์ใช้กรดวาเลอริกเช่นเดิม แปรสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิดให้มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนรวม 20 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30°ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์

และสัดส่วนของโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) เปรียบเทียบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดเพื่อเลือกแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและยังคงให้ผลผลิตปริมาณสูง

9. วิธีหาปริมาณฟรักโทสในน้ำหมัก

ใช้วิธีของ Bernfeld (1955) โดยนำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสมเพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรอยู่ในช่วง 0.2 ถึง 0.8 จากนั้นใช้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid หรือ DNSA reagent, ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างฟรักโทสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

10. วิธีหาปริมาณของแอมโมเนียมในน้ำหมัก

ใช้วิธีของ Kemper (1974) โดยนำน้ำหมักที่ทำการปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำน้ำหมักที่เจือจางแล้วปริมาณ 5 มิลลิลิตร เติมโปแตสเซียมคลอไรด์ (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้น 2 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย EDTA (ภาคผนวก ข) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นเติมฟีนอลไนโตรพัสไซด์รีเอเจนท์ (ภาคผนวก ข) 2 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรด์รีเอเจนต์ (ภาคผนวก ข) 4 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดประจุ 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40° ซ เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอมโมเนียม-ไนเตรเจน (NH_4^+-N) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค) คำนวณหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

11. การวิเคราะห์ปริมาณ PHB โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร

ใช้วิธีของ Brivonese และ Sutherland (1989) ซึ่งปรับปรุงโดย อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) นำน้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร ปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เก็บส่วนของเซลล์มาเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37° ซ นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์แตก จากนั้นเติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วยอะซีโตน 5 มิลลิลิตร ปั่นล้างตะกอนด้วยอัตราเร็ว

เท่าเดิม จากนั้นนำส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วยเอทธานอลบริสุทธิ์ 99.80 เปอร์เซ็นต์ 5 มิลลิลิตร ปั่นล้างตะกอนด้วยอัตราเร็วเท่าเดิม เก็บส่วนตะกอนมาเติมคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 30 วินาที ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปปั่นด้วยอัตราเร็วเท่าเดิมเก็บส่วนใสไว้ นำส่วนที่เป็นตะกอนไปสกัด PHB อีกครั้ง รวมส่วนใสที่ได้ กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ปรับปริมาตรของส่วนใสที่กรองได้ให้ครบ 10 มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยคลอโรฟอร์มในอัตราส่วนที่เหมาะสม แบ่งมา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง อบให้แห้งในตู้อบ 80° ซ เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น 3 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณ PHB โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณ PHB และค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค) คำนวณหาปริมาณ PHB หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

12. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของเทอร์พอลิเมอร์โดยวิธีก๊าซ โครมาโตรกราฟี

ใช้วิธีของ Comean และคณะ (1988) โดยทำการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก โดยปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์มาละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เทใส่ขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร นำไประเหิดแห้งภายใต้สุญญากาศ ชั่งเซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัม ใส่หลอดฝาเกลียว เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร เติมเมทธานอล 2 มิลลิลิตรที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายในปริมาณ 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) ซึ่งมีอนุพันธ์เมทธิลเอสเทอร์ของโมโนเมอร์ไปสกัดแยกกรดและกากเซลล์ด้วยน้ำกลั่นตามวิธีข้างต้น ทำซ้ำ 2 ครั้ง ถ่ายชั้นคลอโรฟอร์มใส่ในหลอดฝาเกลียวขนาด 2 มิลลิลิตร ระเหยคลอโรฟอร์มออกให้หมด เติมไอโซออกเทน 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของโมโนเมอร์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตรกราฟีภายใต้สภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์ : แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด cabowax-PEG
ขนาด 60 m.× 25 mm. ID × 25 μm. df

อุณหภูมิของ injector : 250°ซ (isothermal)

อุณหภูมิของ column : 130°ซ นาน 6 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น180°ซ ด้วยอัตรา 5°ซ ต่อนาที รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 180°ซ

อุณหภูมิของ detector (FID) : 250 °ซ (isothermal)

split ratio : 50 ต่อ 1

ก๊าซตัวพา (carrier gas) : He อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที

ปริมาตรฉีด : 1 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์ชนิดของโมโนเมอร์โดยการเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของสารตัวอย่างกับเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารมาตรฐาน PHB P(3HB-co-20%3HV) และ Na-4HB (ภาคผนวก ค)

การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ของ 3HB 3HV และ4HB (กรัมต่อลิตรต่อ lyophilized cell 20 มิลลิกรัม) โดยใช้โปรแกรม Star chromatogram : Version 4.02 ซึ่งจะทำการคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ (โดยมีสารมาตรฐานภายในเป็นกรดเบนโซอิก 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในสภาวะเดียวกัน

13. การสกัดเทอร์พอลิเมอร์และการทำให้บริสุทธิ์

ใช้วิธีของ Doi และคณะ (1995) โดยทำการปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก โดยปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์ทั้งหมดไประเหิดแห้งภายใต้สุญญากาศ บรรจุเซลล์ระเหิดแห้งลงในถุงกระดาษกรองเบอร์ 2 เย็บปิดด้วยด้ายทุกด้านให้สนิท นำไปใส่ในส่วน extraction ของเครื่อง Soxhlet apparatus สกัดเทอร์พอลิเมอร์ด้วยคลอโรฟอร์มที่อุณหภูมิ 60°ซ นาน 36 ชั่วโมง นำไประเหยคลอโรฟอร์มในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 70°ซ แช่แผ่นฟิล์มด้วยเฮกเซนปริมาตร 4 เท่านาน 24 ชั่วโมง นำแผ่นฟิล์มมาละลายในคลอโรฟอร์มแล้วทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเฮกเซนปริมาตร 5 เท่า อย่างช้าๆทำซ้ำ 3 ครั้ง อบผงเทอร์พอลิเมอร์ให้แห้งเก็บรักษาในเดซิเคเตอร์

14. การเตรียมแผ่นฟิล์มสำหรับการทดสอบคุณสมบัติเชิงกลและคุณสมบัติทางกายภาพ

ใช้วิธีของ Yoshie และคณะ (1995) โดยละลายเทอร์พอลิเมอร์ด้วยคลอโรฟอร์มให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เตรียมแผ่นฟิล์มโดยวิธีการเทสารละลายเทอร์พอลิเมอร์ลงในแม่พิมพ์ ที่ปรับระดับให้เท่ากันทุกด้าน ปริมาตรของสารละลายเทอร์พอลิเมอร์ขึ้นอยู่กับขนาดของแม่พิมพ์ โดยควรให้ได้แผ่นฟิล์มหนาประมาณ 0.050 มิลลิเมตร (ไม่ควรหนาต่ำกว่า 0.025 มิลลิเมตร) ทิ้งให้คลอโรฟอร์มระเหยในตู้ควันที่อุณหภูมิห้อง นำไปอบแห้งในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 60°ซ นาน 48 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้แผ่นฟิล์มตกผลึกที่อุณหภูมิห้องนาน 12 ชั่วโมง จึงทำการแกะออกจากแม่พิมพ์ ก่อนนำแผ่นฟิล์มไปทำการทดสอบจะต้องมีการตกผลึกอย่างสมบูรณ์เป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 7 วัน วัดความหนาของแผ่นฟิล์ม (มิลลิเมตร) ด้วย

เครื่องมือวัดความหนาของแผ่นพอลิเมอร์ รุ่น 7301 ของบริษัท Mitutoya ประเทศญี่ปุ่น (เครื่องมือที่ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

15. การหาสมบัติทางกายภาพ และเชิงกลของเทอร์พอลิเมอร์

15.1 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารผลิตภัณฑ์โดยเครื่อง Gel Permeation Chromatography (GPC)

ใช้วิธีของ Abate และคณะ (1995) โดยละลายเทอร์พอลิเมอร์ในคลอโรฟอร์มชนิดเกรด HPLC เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ กรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน นำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography

detector	: Differential Refractometry (RI)
คอลัมน์	: Ultrastyragel 10^5 Å ต่อด้วย 10^4 Å
อุณหภูมิ	: อุณหภูมิห้อง
สารละลายตัวพา	: คลอโรฟอร์มชนิดเกรด HPLC
อัตราการชะ	: 1 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรฉีด	: 60 ไมโครลิตร

คำนวณน้ำหนักโมเลกุลของเทอร์พอลิเมอร์ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ พอลิสไตรีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 9.1×10^3 ถึง 3.84×10^6 ซึ่งทำการวิเคราะห์ในสภาวะเดียวกัน (ภาคผนวก ค)

15.2 การวิเคราะห์อุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature, Tm) ค่าความร้อนของการหลอมเหลว (heat of fusion) และอุณหภูมิกลาสทรานซิชัน (glass transition temperature, Tg) โดยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC)

ใช้วิธีของ Shi และคณะ (1996) โดยชั่งเทอร์พอลิเมอร์ให้มีน้ำหนักในช่วง 5-10 มิลลิกรัม ต่อชิ้น ใส่ในถ้วยชนิดอะลูมิเนียม (aluminium crucible) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ทำการวิเคราะห์ภายใต้สภาวะไนโตรเจน โดยทำการวิเคราะห์เป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

1. หาค่าอุณหภูมิหลอมเหลวและค่าความร้อนของการหลอมเหลว โดยเพิ่มอุณหภูมิจาก 30 °ซ ถึง 180 °ซ ด้วยอัตรา 10 °ซ ต่อนาที

2. ลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วจาก 180 °ซ ถึง -80 °ซ แล้ววิเคราะห์หาค่า Tg โดยเพิ่มอุณหภูมิจาก -80 °ซ ถึง 180 °ซ ด้วยอัตรา 10 °ซ ต่อนาที ภายใต้สภาวะไนโตรเจน

โดยมีสารมาตรฐานเปรียบเทียบคือ Al_2O_3

15.3 การทดสอบสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มโดยเครื่อง Universal testing machine

เตรียมแผ่นฟิล์มตามวิธีมาตรฐาน ASTM D882-91 (annual book of ASTM standard, V08.01) ซึ่งกำหนดให้แผ่นฟิล์มมีความหนาไม่ต่ำกว่า 0.025 มิลลิเมตร กว้าง 50 มิลลิเมตร ยาว 150 มิลลิเมตร โดยเป็นระยะทดสอบ 100 มิลลิเมตร ที่เหลือด้านละ 25 มิลลิเมตร เป็นระยะยึดของเขี้ยวจับสำหรับเครื่อง Instron testing machine ดึงด้วยอัตรา 10 มิลลิเมตรต่อนาที จนชิ้นตัวอย่าง (specimen) ขาด ทั้งนี้ต้องทำการทดสอบ 5 ซ้ำต่อ 1 ตัวอย่าง ค่าทดสอบที่ได้คือ Load at Max.Load (N), Displacement at Max.Load (mm.), Stress at Max.Load (MPa), %Strain at Max.Load (%), Toughness (MPa), Modulus (MPa) นำค่าทดสอบที่ได้เปรียบเทียบกับค่าทดสอบของพลาสติกจากปิโตรเคมีซึ่งทำการทดสอบในสภาวะเดียวกัน

15.4 การวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบระดับความเป็นผลึกของแผ่นฟิล์มโดยเครื่อง X-Ray powder Diffractometer (XRD)

ใช้วิธีของ Bluhm และคณะ (1986) โดยตัดแผ่นฟิล์มที่มีความหนาไม่ต่ำกว่า 0.05 มิลลิเมตรวางบนแผ่นสไลด์ให้ห่างจากขอบ 1.5 เซ็นติเมตร ทำการวิเคราะห์โดยใช้ nickel-filtrated Cu Kα เป็นแหล่งกำเนิด radiation (λ = 0.1542 นาโนเมตร, 2θ = 4-80°, 40 kV, 30 mA)