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, Germany
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 Memert, Germany
หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA-36	บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan

1.1 อุปกรณ์ (ต่อ)

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
ถังหมัก (fermentor) ขนาด 5 ลิตร และชุดควบคุม รุ่น MD 300	บริษัทL.E.Marubishi Co.,Ltd, Japan
เครื่องอุปกรณ์หล่อเย็น (circulation cooler)	บริษัท Marubishi, Japan
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W 760	บริษัท Memert, Germany
เครื่องให้ความร้อน (stirring hot plate) รุ่น DS 201HS	บริษัท DMS, Japan
เครื่องระเหิดแห้งระบบสุญญากาศ (lyophillizer) รุ่น Eyela FD-1	บริษัท Tokyo Rikakikai, Japan
เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography) รุ่น 3400 C	บริษัท Varian, USA.
เครื่องสำหรับฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ (auto sampler) รุ่น 8200CX	บริษัท Varian, USA
แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด cabowax-PEG ขนาด 60 m. x 25 mm. ID x 25 μm. df	บริษัท Restex, USA
เครื่องผลิตก๊าซไฮโดรเจน (hydrogen generator) รุ่น 9200	บริษัท Packard, USA.
เครื่องผลิตอากาศ (air compressor) รุ่น WL 50500AJ	บริษัท Compbell Hausfeld, USA.
ไมโครปิเปตขนาด 100, 200 และ 1000 μl	บริษัท Gilson, France
ชุด soxhlet apparatus ขนาด 1,000 มิลลิลิตร	บริษัท Brand GMBH, Germany
กรดวาเลอริก ($C_5H_{10}O_2$)	บริษัท Sigma Chemical, USA.
ฟรักโทส (food grade)	รามาโพรดักส์, ไทย
1,4-บิวเทนไดออล [$HO(CH_2)_4OH$]	บริษัท Aldrich Chemical, USA.

1.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
พอลิ(บีตา-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.
กรดซัลฟุริก	บริษัท E. Merk Damstadt, Germany
กรดเบนโซอิก ($C_7H_6O_2$)	บริษัท Nacalai tesque, Japan
แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]	บริษัท E. Merk Damstadt, Germany
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($Na_2HPO_4.2H_2O$)	บริษัท E. Merk Damstadt, Germany
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	บริษัท E. Merck Damstadt, Germany
โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	บริษัท E. Merck Damstadt, Germany
แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต [$(NH_4)_6MO_7O_{24}.4H_2O$]	บริษัท J.T.Baker, USA.
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	บริษัท Carlo erba ,Italy
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	บริษัท E. Merck Damstadt, Germany
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	บริษัท E. Merck Damstadt, Germany

1.2 เคมีภัณฑ์(ต่อ)

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	บริษัท E. Merck Damstadt, Germany
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	บริษัท May&Baker , England
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	บริษัท E. Merck Damstadt, Germany
กรดบอริก (H_3BO_3)	บริษัท E. Merck Damstadt, Germany
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO4.7H_2O$)	บริษัท Carlo erba , Italy
โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl)	บริษัท The Clorox Company, USA.
คลอโรฟอร์ม (เกรด HPLC)	บริษัท J.T. Baker , USA.
คลอโรฟอร์ม	บริษัท J.T. Baker , USA.
ไดคลอไรมีเทน (เกรด 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

1.3 เคมีภัณฑ์ประเภทอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture media)

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
สารสกัดจากยีสต์	บริษัท Difco , USA.
สารสกัดจากเนื้อ	บริษัท Difco , USA.
เปปโตน	บริษัท Difco , USA.
พอลิเปปโตน	บริษัท Becton Dickinson , USA.

2. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้คือ *Alcaligenes* sp. A-04 ซึ่งคัดเลือกโดยอรุณ 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

สารสกัดจากยีสต์	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 อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

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

สารละลาย trace element ใน 1 M HCl 1 ลิตร ประกอบด้วย

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

แยกละลายเกลือ , แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต และ trace element เมื่อละลายแล้ว จึงนำมารวมกัน ปรับ pH เป็น 7.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3.00 โมลาร์ นึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

4. วิธีการเก็บรักษาเชื้อและการเตรียมกล้าเชื้อ

4.1 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) สำหรับเก็บรักษาเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ นำมาเขี่ยลากเชื้อลงบนอาหารใหม่ (subculture) ทุก ๆ 1 เดือน

4.2 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงเป็นกล้าเชื้อ

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

4.3 การคัดเลือกอายุกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เพื่อให้ได้เชื้อที่มีปริมาณมากและมีประสิทธิภาพในการผลิตโคพอลิเมอร์ได้สูง

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 4.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (2 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำตาลฟรักโตส และกรดวาเลอริกอัตราส่วน 18:2 กรัมต่อลิตร (อัญชนา ศุรติขจร 2537) เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 °ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณฟรักโทสที่เหลือในอาหาร (กรัมต่อลิตร) และปริมาณ PHA ที่ผลิตได้ (เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและกรัมต่อลิตร) นำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเจริญเติบโต แล้วคัดเลือกอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมในการเตรียมกล้าเชื้อ เพื่อให้ได้เชื้อปริมาณมากและมีประสิทธิภาพในการผลิตโคพอลิเมอร์สูง

5. การเตรียมกล้าเชื้อสำหรับการผลิต P(3HB-co-3HV)

เลี้ยงกล้าเชื้อโดยวิธีตามข้อ 4.2 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมซึ่งได้จากการศึกษาในหัวข้อ4.3 โดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้อายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 4.3 นำกล้าเชื้อที่ได้มาปั่นแยกเอาส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อออก แล้วกระจายเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต P(3HB-co-3HV) จากข้อ 3.3 (อาหาร MSM) ถ่ายเชื้อปริมาณที่ต้องการโดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของเชื้อเมื่อเทียบกับค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของกราฟมาตรฐานลงในถังหมัก

6. การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อการเจริญและการผลิต P(3HB-co-3HV) จากเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยการเลี้ยงเชื้อแบบแบช

เตรียมกล้าเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ตามวิธีการที่บรรยายในข้อ 5. จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อปริมาณ 1.5 กรัมต่อลิตร ลงสู่ถังหมักซึ่งมีอาหาร MSM ที่ประกอบด้วย ฟรักโตสเท่ากับ 18 กรัมต่อลิตร และ กรดวาเลอริกเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร ปริมาตรเริ่มต้น 2.5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 ^{o}ซ อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.8 vvm. ควบคุมความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 (ชนัญ ผลประไพ 2537) จากนั้นจึงศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีต่อการเพิ่มปริมาณเซลล์ และปริมาณ P(3HB-co-3HV)

6.1 การศึกษาผลของปริมาณกล้าเชื้อ

เตรียมกล้าเชื้อตามวิธีในข้อ 5 แปรผันปริมาณของน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.5 1.7 1.8 1.9 กรัมต่อลิตร ถ่ายกล้าเชื้อลงในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลฟรักโตส และกรดวาเลอริกอัตราส่วน 18:2 กรัมต่อลิตร (อัญชนา ศุรติขจร 2537) ที่อยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยปริมาตรของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 2.5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.8 vvm. ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 7.0

6.2 การศึกษาผลของการควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 เปรียบเทียบระหว่างภาวะที่ควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 6.0 7.0 8.0 และไม่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างตลอดการเลี้ยงเชื้อ ส่วนที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างโดยเติม 3 M NaOH หรือ 3 M HCl และภาวะที่ไม่มีการควบคุมความเป็นกรดด่าง ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 7.0

6.3 การศึกษาปริมาณอัตราส่วนฟรักโตสและกรดวาเลอริก ที่มีผลต่อการเจริญ และการสร้าง P(3HB-co-3HV)

เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่มีการแปรผันอัตราส่วนของน้ำตาลฟรักโตสและกรดวาเลอริก ดังนี้คือ 15:5 16:4 17:3 18:2 19:1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

6.4 การหาปริมาณแหล่งไนโตรเจนจำกัด

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือ แอมโมเนียมซัลเฟต โดยแปรผันความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แหล่งคาร์บอนเป็นฟรัก-โตสและกรดวาเลอริกที่ได้จากการศึกษาในข้อ 6.3 และสารอาหารชนิดอื่นตามสูตร MSM ที่แสดงในข้อ 3.3

6.5 การหาปริมาณแหล่งฟอสเฟตจำกัด

แหล่งฟอสเฟตที่ใช้คือ โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โดยแปรผันความเข้มข้นควบคู่กัน ใช้อัตราส่วนระหว่าง $KH_2PO_4 : Na_2HPO_4$ ดังนี้คือ 0.5:0.15 1.0:0.3 2.0:0.6 4.0:1.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แหล่งคาร์บอนเป็นฟรักโตสและกรดวาเลอริก ในความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 6.3 แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 6.4 และสารอาหารอื่นตามสูตร MSM ที่แสดงในข้อ 3.3

6.6 การหาปริมาณแมกนีเซียมจำกัด

แหล่งแมกนีเซียมที่ใช้คือ แมกนีเซียมซัลเฟต โดยแปรผันความเข้มข้นเท่ากับ 0.05 0.1 0.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แหล่งคาร์บอนเป็นฟรักโตสและกรดวาเลอริกในความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 6.3 แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 6.4 และสารอาหารอื่นตามสูตร MSM ที่แสดงในข้อ 3.3

6.7 การศึกษาปริมาณอากาศที่เติมลงอาหารสำหรับการผลิต P(3HB-co-3HV)

เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมซึ่งได้จากการศึกษาในข้อ 6.3 6.4 6.5 และ 6.6 โดยควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และใช้ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 6.2 แปรค่าอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศเพื่อให้ค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักแตกต่างกัน โดยแปรผันค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักเท่ากับ 200 rpm. 0.2 vvm 200 rpm. 1.6 vvm. 300 rpm. 0.6 vvm. และ 600 vvm 1.8 rpm.

7. การเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ และปริมาณ P(3HB-co-3HV) โดยการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบช

7.1 การเติมสารอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีสัดส่วนโมลของ C/N แตกต่างกัน

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-014 ดังในข้อ 5 โดยใช้สารอาหารเริ่มต้นได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งเกลือแร่ต่างๆ ที่ได้จากการศึกษาในข้อที่ 6 เมื่อเลี้ยงเชื้อจนถึงชั่วโมงที่ 12 เติมสารอาหารที่มีอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ดังนี้คือ 5 50 100 200 และ 300 โมลต่อโมล ดังแสดงวิธีเตรียมในภาคผนวก ก และมีชุดควบคุมที่มีการเติมเฉพาะแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว การเติมสารอาหารเติมโดยใช้หลักจากการคำนวณจากสมการของ Scragg (1991) โดยแบ่งการเติมเป็นช่วงๆ เติมห่างกันครั้งละ 6 ชั่วโมง ติดตามการเจริญ และการสร้าง P(3HB-co-3HV) เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

7.2 การเติมสารอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งเกลือแร่

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-014 ตามวิธีในข้อ 5 โดยใช้สารอาหารเริ่มต้นได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งเกลือแร่ต่างๆ ที่ได้จากการศึกษาในข้อที่ 6 เมื่อเลี้ยงเชื้อจนถึงชั่วโมงที่ 12 เติมสารอาหารที่มีอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนอัตราส่วนโมล ที่เหมาะสมเท่ากับที่ศึกษาได้จากข้อ 7.1 และการเติมเหมือนกับข้อ 7.1 แต่เพิ่มการเติมแหล่งเกลือแร่คือ โปแตสเซียมไค-ไฮโดรเจนฟอสเฟต ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต และสารละลาย trace element ในแต่ละครั้งให้มีปริมาณสารแต่ละชนิดเท่ากับความเข้มข้นเริ่มต้น (วิธีการเตรียมในภาคผนวก ก) โดยจะแบ่งเป็นชุดการทดลองดังนี้

1) เติมแหล่งคาร์บอนที่มี C/N เท่ากับ 100 ทุกๆ 6 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 42 และเติมแหล่งเกลือแร่ที่ชั่วโมงที่ 12

2) เติมแหล่งคาร์บอนที่มี C/N เท่ากับ 100 ทุกๆ 6 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 42 และเติมแหล่งเกลือแร่ที่ชั่วโมงที่ 18

3) เติมแหล่งคาร์บอนที่มี C/N เท่ากับ 100 ทุกๆ 6 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 42 และเติมแหล่งเกลือแร่ที่ชั่วโมงที่ 12 และ 36

4) เติมแหล่งคาร์บอนที่มี C/N เท่ากับ 100 ทุกๆ 6 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 42 และเติมแหล่งเกลือแร่ที่ชั่วโมงที่ 12 24 และ 30

5) เติมแหล่งคาร์บอนที่มี C/N เท่ากับ 100 ทุกๆ 6 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 42 และเติมแหล่งเกลือแร่ที่ชั่วโมงที่ 12 24 30 36 และ 42

8. การศึกษาการเจริญของ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยหาค่าความเข้มข้นของเซลล์ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำหมักที่เก็บได้ในแต่ละช่วงเวลามาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.2-0.6 นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

9. วิธีหาปริมาณฟรักโทสในน้ำหมัก

ใช้วิธีของ Bernfeld (1955) โดยนำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสม มาเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid หรือ DNSAreagent , ภาคผนวก ก) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างฟรักโทสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

10. วิธีหาปริมาณกรดวาเลอริกในน้ำหมัก

ใช้วิธีของ Ramsay (1990) โดยนำน้ำหมักที่ทำการปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว ปริมาณ 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดฝาเกลียว เติมเมทธานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยกรดซัลฟุริกเข้มข้น (acidified methanol) 2 มิลลิลิตรที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายในปริมาณ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 60 °ซ นาน 1.0 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น และไดคลอโรมีเธนอย่างละ 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงนาน 5 นาที และปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกเอาชั้นของไดคลอโรมีเธน(ชั้นล่าง) ซึ่งมีอนุพันธ์เมทธิลเอสเทอร์

ของโมโนเมอร์ แล้วนำมาวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของโมโนเมอร์ ด้วยวิธีก๊าซ โครมาโตกราฟฟี ภายใต้สภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์	: แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด cabowax-PEG ขนาด 60 m. x25 mm. ID x 25 μm df
อุณหภูมิของ injector	: 250 °ซ (isothermal)
อุณหภูมิของ column	: 130 °ซ นาน 6 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 180 °ซ ด้วย อัตรา 15 °ซ ต่อนาที รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 180 °ซ นาน 6.3 นาที
อุณหภูมิของ detector(FID)	: 250 °ซ (isothermal)
split ratio	: 50:1
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	: N_2 อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรฉีด	: 1 ไมโครลิตร

การคำนวณปริมาณกรดวาเลอริก โดยใช้โปรแกรม Star chromatogram : Version 4.02 ซึ่งจะทำการคำนวณปริมาณกรด (โดยมีสารมาตรฐานภายในเป็นกรดเบนโซอิก 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในสภาวะเดียวกัน แสดงโครมาโตร แกรม และกราฟมาตรฐานของกรดวาเลอริกในภาคผนวก ค

11. วิธีหาปริมาณของแอมโมเนียมในน้ำหมัก

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

12. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของโคพอลิเมอร์โดยวิธีก๊าซ โครมาโตกราฟฟี

ใช้วิธีของ Comeau และคณะ (1988) โดยทำการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักโดยปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์มาละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เทใส่ขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร นำไประเหิดแห้งภายใต้สูญญากาศชั่งเซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัมใส่หลอดฝาเกลียว เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร เติมแอซิดิไฟด์เมทธานอล 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 แล้วนำมาวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของโมโนเมอร์ ด้วยวิธีก๊าซ โครมาโตกราฟฟี ภายใต้สภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์	: แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด cabowax-PEG ขนาด 60 m. x25 mm. ID x 25 μm df
อุณหภูมิของ injector	: 250 °ซ (isothermal)
อุณหภูมิของ column	: 130 °ซ นาน 6 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 180 °ซ ด้วย อัตรา 5 °ซ ต่อนาที รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 180 °ซ นาน 3.3 นาที
อุณหภูมิของ detector(FID)	: 250 °ซ (isothermal)
split ratio	: 50:1
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	: N_2 อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรฉีด	: 1 ไมโครลิตร

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

การแสดงปริมาณโคพอลิเมอร์ นิยมแสดงเป็นปริมาณต่อปริมาตรของอาหารที่ใช้เลี้ยง(กรัมต่อลิตร) หรือ แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของปริมาณต่อน้ำหนักเซลล์(เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)

การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ของ 3HB และ3HV (กรัมต่อลิตรต่อ lyophilized cell 20 มิลลิกรัม) โดยใช้โปรแกรม Star chromatogram : Version 4.02 ซึ่งจะทำการคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ (โดยมีสารมาตรฐานภายในเป็นกรดเบนโซอิก 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในสภาวะเดียวกัน แสดงโครมาโตรแกรม และกราฟมาตรฐานของสารต่างในภาคผนวก ค