บทที่2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

1.อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

1.1อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต,ประเทศ
เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี(gas chromatography) รุ่น 3400CX	Varian,USA.
เครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ(autosampler) รุ่น 8200CX	Varian,USA.
แคปพิลลารี คอลัมน์(capillary column)ชนิด carbowax-PEG เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มม. ความยาว 60ม.	Restex,USA.
เครื่องผลิตก๊าซไฮโดรเจน(hydrogen generator) รุ่น 9200	Packard,USA.
เครื่องผลิตอากาศ(air compressor) รุ่น WL505000AJ	Campbell Hausfeld,USA.
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ(psychotherm incubator shaker) รุ่น G27 แบบหมุน(rotary)	New Brunswick Scientific, USA.
เครื่องชั่งละเอียด(analytical balance) รุ่นA200S	Sartorious,Germany
เครื่องชั่งหยาบ(laboratory balance) รุ่น L2200P	Sartorious,Germany
เครื่องปั่นเหวี่ยง(centrifuge) รุ่น KS-3000P	Kubota,Japan
เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ รุ่นCentrikon T-42k	Kontron,Italy
เครื่องระเหิดแห้ง(lyophilizer)รุ่น Eyela FD-1	Tokyo Rikakikai,Japan
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง(VIS spectrophotometer)รุ่น Novaspec II	Pharmacia Biotech,England
เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง(pH meter) รุ่น 2000	Cyberscan,Singapore
ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124	ISSCO,USA.
ตู้อบฆ่าเชื้อ(hot air oven) รุ่นUL-60	Memmert,Germany
ตู้อบแห้ง(dryer oven) รุ่น UL-80	Memmert,Germany
หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ(autoclave) รุ่น SS-325	Tomy,Japan
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ(waterbath) รุ่น W760	Memmert,Germany
เครื่องให้ความร้อน(stirring hot plate) รุ่น DS201HS	DMS,Japan

1.1อุปกรณ์ (ต่อ)

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต,ประเทศ
ถังหมัก(fermentor)ขนาด 5 ลิตร รุ่น Eyela MBF500-ME ชุดควบคุมรุ่น EPC1000 และเครื่องอัดอากาศ (air compressor)รุ่น MAU-2	Tokyo Rikakikai,Japan
อุปกรณ์หล่อเย็น(circulation cooler)รุ่น Eyela CA-1100	Tokyo Rikakikai,Japan
ไมโครปิเปตขนาด 100 200 และ 1000มล.	Gilson,France

1.2เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต,ประเทศ
กรดซัลฟูริกเข้มข้น[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[$C_7H_6O_2$]	Nacalai Tesque,Japan
กากน้ำตาล	ไทยเมจิฟาร์มาซูติคัล,ไทย
คลอโรฟอร์ม[CH_3Cl]	E.Merck Damstadt,Germany
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต[$CuSO_4.5H_2O$]	J.T.Baker,USA.
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
น้ำตาลทราย	มิตรผล,ไทย
โซเดียมคลอไรด์[NaCl]	ปรุงทิพย์,ไทย
โซเดียมไฮดรอกไซด์[NaOH]	Carlo Erba,Italy
โซเดียมไฮโปรคลอไรท์[NaOCl]	Clorox,USA.
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต[Na_2HPO_4]	Fluka,Germany
นิคเกิลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต[$NiCl_2.6H_2o$]	E.Merck Damstadt,Germany
พอลีเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต	Sigma Chemical,USA.
พอลิเปปโตน [polypeptone]	Becton Dickinson,USA.
โพแตสเซียมคลอไรด์[KCl]	Carlo Erba,Italy
โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต[KH_2PO_4]	Univar,Australia
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต[$FeSO_4.7H_2O$]	Unilab,USA.

1.2เคมีภัณฑ์ (ต่อ)

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต,ประเทศ
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.
อะซีโตน[C_3H_6O]	J.T.Baker,USA.
เอธานอล[C_2H_5OH]	E.Merck Damstadt,Germany
เอนไซม์อินเวอร์เทส(grade V EC3.2.1.26)	Sigma Chemical,USA.
เอนไซม์ยูเรียเอส(urease,EC3.5.1.5)	E.Merck Damstadt,Germany
แอมโมเนียมซัลเฟต[$(NH_4)_2SO_4$]	May & Baker,England
แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต[$(NH_2)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$]	J.T.Baker,USA.

2. จุลินทรีย์

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

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ(stock culture medium) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

beef extract	3	กรัม
polypeptone	5	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม

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

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

yeast extract	10	กรัม
polypeptone	10	กรัม
beef extract	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 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการสร้างและสะสม PHB คือ อาหาร MSM(mineral salt medium) ซึ่งปรับปรุงโดยรัตนศิริ มุทิตากุล(2538) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

กากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar)	20.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1.0	กรัม
โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัม
yeast extract	0.1	กรัม
สารละลาย trace element	1.0	มิลลิลิตร

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

สารละลาย trace element ใน 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

4. วิธีการเก็บรักษาเชื้อและเตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

4.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอียง(agar slant) สำหรับเก็บรักษาเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาเขี่ยลากเชื้อลงบนอาหารใหม่(subculture)ทุกๆ 1 เดือน

4.2 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเป็นกล้าเชื้อ

นำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ตามข้อ 4.1 มาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์(0.85%) เพื่อเป็นสารละลายแขวนลอย ปรับความเข้มข้นให้มีค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5

5. การศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเติบโต

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 4.2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร(4%ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร เลี้ยง

เชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และคำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะ(μ)

6. การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต PHB

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ตามข้อ5 ถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลวเพื่อการผลิต PHB ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร เปรียบเทียบการผลิต PHB ระหว่างการใช้กากน้ำตาลและน้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที pHเริ่มต้น6.0 เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 18 24 30 และ 36 นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHBที่ผลิตได้

7. การศึกษาผลของชนิดและปริมาณของแร่ธาตุในสารละลาย trace element

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ตามข้อ5 ถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลวเพื่อการผลิต PHB ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร แปรผันชนิดและปริมาณแร่ธาตุในสารละลาย trace element ดังแสดงในตารางที่7 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที pH เริ่มต้น6.0 เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 24 30 และ 36 นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHBที่ผลิตได้

8. การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิต PHB

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ตามข้อ 5 ถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลวเพื่อการผลิต PHB ที่มีการเติมสารละลาย trace element สูตรที่เหมาะสม ที่ได้จากการศึกษาตามข้อ 8 ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร และใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน เปรียบเทียบการผลิต PHB จากการใช้แหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด คือ แอมโมเนียมซัลเฟต (1กรัมต่อลิตร) หรือ ยูเรีย (0.46 กรัมต่อลิตร) โดยคิดเป็นปริมาณธาตุไนโตรเจนที่เท่ากัน เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที pHเริ่มต้น6.0 เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณไนโตรเจน

ตารางที่7.แสดงองค์ประกอบของ trace element สูตรต่างๆ ซึ่งเตรียมในHCl 1 โมลาร์

ชนิดของแร่ธาตุ (กรัมต่อลิตร)	สูตร1 (สูตรควบคุม)	สูตร2	สูตร3
$CaCl_2$	20.0	20.0	-
$ZnSO_4.7H_2O$	1.3	1.30	0.1
$FeSO_4.7H_2O$	0.2	0.20	-
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	0.6	0.60	0.32
H_3BO_3	0.6	0.60	0.30
$MnCl_2.4H_2O$	-	0.08	0.03
$CoCl_2.6H_2O$	-	0.50	0.20
$CuSO_4.5H_2O$	-	0.05	0.07
$NiCl_26H_2O$	-	0.02	0.02

9. การศึกษาผลของกรดซิตริกต่อการผลิต PHB

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ตามข้อ5 ถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลวเพื่อการผลิต PHB ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร ใช้สูตร trace element แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต ซึ่งได้จากการศึกษาตามข้อ 6-8 และมีการเติมกรดซิตริกในปริมาณต่างๆกันคือ 0.2 0.5 0.75 และ1.0 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที pHเริ่มต้น6.0 เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณไนโตรเจน

10. การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต PHB ในถังหมัก

10.1 การศึกษาหาปริมาณของกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิต PHB ในถังหมัก

เลี้ยงกล้าเชื้อตามข้อ 5 จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 3 ลิตร ประกอบด้วยสารอาหารตามข้อ 3.3 โดยมีการแปรผันความเข้มข้นกล้าเชื้อ 0.2 0.3 และ0.5 กรัมต่อลิตร(คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH 6.0 และค่าออกซิเจนละลาย(dissolved oxygen) 60% ของอากาศอิ่มตัว ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ PHB ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

10.2 ผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีต่อการเติบโตและการผลิต PHB

ถ่ายกล้าเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019ที่ได้จากการเลี้ยงตามข้อ 5 โดยใช้ความเข้มข้นกล้าเชื้อที่ได้จากการศึกษาตามข้อ 10.1 ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 3 ลิตร ใช้กากน้ำตาลและยูเรียเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ สารละลาย trace element สูตรที่2 และมีการเติมกรดซิตริก 0.75 กรัมต่อลิตร แปรผันอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10 25 50 และ 100 โมลต่อโมล ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 6.0 และค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 60 % ของอากาศอิ่มตัวตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณไนโตรเจน

10.3 หา pH ที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 และใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมตามข้อ 10.2 แปรผันการควบคุมค่า pH เท่ากับ 6.0 7.0 และ 8.0 และไม่ควบคุม pH (ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.0) ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส pH 6.0 และค่าออกซิเจนละลาย 60 % ของอากาศอิ่มตัวตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณไนโตรเจน

10.4 การศึกษาผลของออกซิเจนละลายต่อการผลิต PHB

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ตามข้อ 10.2 ควบคุมภาวะการเลี้ยงเชื้อในถังหมักดังนี้ อุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส pHที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ10.3 แปรผันปริมาณออกซิเจนละลาย 40 60 และ80 % ของอากาศอิ่มตัว เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณไนโตรเจน

11. การผลิต PHB โดยการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ตามข้อ 5 และใช้ผลที่ได้จากการศึกษาในข้อ 6-10 สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ fed-batch ซึ่งมีการควบคุมการป้อนสารอาหารเข้าสู่ระบบโดยใช้ pH-stat เป็น feedback parameter นั่นคือ เมื่อสารอาหารจำเป็นในระบบหมดไป ค่า pH จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงมีการเติมสารอาหารเข้าสู่ถังหมัก ค่า pH ที่ควบคุมเท่ากับ 7.0+0.1 เมื่อค่า pH เปลี่ยนแปลงจะมีการป้อนสารอาหารเข้าสู่ถังหมักอัตโนมัติ เริ่มมีการป้อนสารอาหารประมาณชั่วโมงที่ 8-9 ของการเลี้ยงเชื้อ ใช้ถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีปริมาตรสารอาหารเริ่มต้น 2.5 ลิตร ซึ่งประกอบด้วยอาหารสูตรที่เหมาะสมที่ได้จากผลการศึกษาจากข้อ 5-10 โดยมีกากน้ำตาลและยูเรียเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ ภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ดังนี้ ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 7.0 สำหรับการควบคุมค่าออกซิเจนละลายจะแตกต่างกันไปในแต่ละ

การทดลอง เนื่องจากข้อจำกัดของอุปกรณ์การให้อากาศในระบบมีจำกัด และขึ้นอยู่กับปริมาณความหนาแน่นของเซลล์ที่แตกต่างกันในแต่ละสภาวะของการเลี้ยงเชื้อด้วย

11.1 การศึกษาการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch โดยสารอาหารป้อนเข้ามีเฉพาะแหล่งคาร์บอนเท่านั้น คือ กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร ควบคุมค่าออกซิเจนละลายที่ 60 % ของอากาศอิ่มตัว เป็นระยะเวลา12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 25 โมลต่อโมล ทำการเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

11.2 การศึกษาการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 แบบ fed-batch ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน คือ กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตรและยูเรีย โดยมีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารละลายป้อนเข้าเท่ากับ 25 โมลต่อโมล ควบคุมค่าออกซิเจนละลายที่ 60 % ของอากาศอิ่มตัว เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นใช้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 25 โมลต่อโมล ทำการเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

11.3 การศึกษาการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 แบบ fed-batch โดยการเติมกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน และเติมแร่ธาตุ (MSM) เป็นสารละลายป้อนเข้า อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารละลายป้อนเข้าเท่ากับ 25 โมลต่อโมล ควบคุมค่าออกซิเจน ละลาย 60 % ของอากาศอิ่มตัว เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจรนเท่ากับ 25 โมลต่อโมล ทำการเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

11.4 การศึกษาการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 แบบ fed-batch ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุ เป็นสารละลายป้อนเข้า และใช้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 25 โมลต่อโมล โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 400 กรัมต่อลิตร ควบคุมค่าออกซิเจนละลาย 60 % ของอากาศอิ่มตัว เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 25 โมลต่อโมล ทำการเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

11.5 การศึกษาการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 แบบ fed-batch ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุ เป็นสารละลายป้อนเข้า ความเข้มข้นของกากน้ำตาลซึ่งมีน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับเท่ากับ 400 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน 10 โมลต่อโมล ควบคุมค่าออกซิเจนละลายที่ 60 % ของอากาศอิ่มตัว เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 โมลต่อโมล ทำการเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 30 ชั่วโมง

12. การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตรมาปั่นแยกเซลล์ โดยการเซนตริฟิวส์ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปใส่ในถ้วยอลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว อบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักถ้วยที่มีเซลล์อบแห้ง คำนวณหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง(ภาคผนวก ข) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

13. การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในรูปน้ำตาลรีดิวซ์

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์แล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสมปริมาตร0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 4.5 บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Bernfeld(1955) โดยเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก(dinitrosalicylic acid, DNSA ภาคผนวก ก) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำตาลซูโครสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร(ภาคผนวก ค) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

14. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี

(High Performance Liquid Chromatography : HPLC)

เตรียมน้ำตาลที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 20 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน นำส่วนที่กรองได้ไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์หาน้ำตาลกลูโคส ฟรักโตสและซูโครส โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีก (peak area) ของน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด โดยวิเคราะห์ภายใต้ภาวะดังนี้ (ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

ชนิดของคอลัมน์	: Phenomenax Spherisorb NH_2 LCD
ชนิดของดีเทคเตอร์	: Refractive Index Detector
Flow rate	: 2มิลลิลิตรต่อนาที
Mobile phase	: 90%อะซีโตไนไตรล์ในน้ำ(ปริมาตรต่อปริมาตร)
ปริมาตรสารตัวอย่าง	: 5 ไมโครลิตร

15. การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก

ตามวิธีของ Kemper(1974) โดยนำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ (ภาคผนวก ก) ความเข้มข้น 5 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร เติมสารละลายEDTA (ภาคผนวก ก) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอลไนโตรพัสไซด์(ภาคผนวก ก) 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรท์ (ภาคผนวก ก) 4 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดประจุ 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจน (NH_4^+-N) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร(ภาคผนวก ข)

16. การวิเคราะห์หาปริมาณยูเรีย

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 แล้ววิเคราะห์หาปริมาณยูเรียต่อโดยวิธีของ Kemper(1974) คำนวณปริมาณยูเรียในหน่วยกรัมต่อลิตร(ภาคผนวก ข)

17. การวิเคราะห์ปริมาณ PHBโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟฟี(Gas Chromatography:GC)

ตามวิธีของ Comeauและคณะ(1988) โดยทำการปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์มาละลายในน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร เทใส่ขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไประเหิดแห้งภายใต้สุญญากาศ ชั่งเซลล์แห้งน้ำหนัก 20 มิลลิกรัม ใส่หลอดฝาเกลียว เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร เติมเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยซัลฟูริกเข้มข้น ร้อยละ 3(3% acidified methanol) 2 มิลลิลิตรที่กรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3.5 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง 5 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บชั้นคลอโรฟอร์ม(ชั้นล่าง) ซึ่งมีอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ของโมโนเมอร์ ไปสกัดแยกกรดและกากเซลล์ด้วยน้ำกลั่นตามวิธีข้างต้นอีกครั้ง ถ่ายชั้นคลอโรฟอร์มใส่หลอดฝาเกลียวสำหรับวิเคราะห์ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟฟี ระเหยคลอโรฟอร์มออกให้หมด เติมไอโซออกเทน 1 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ปริมาณ PHB โดยวิธี GC ภายใต้ภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์	: แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด 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
อุณหภูมิของdetector(FID)	: 250 องศาเซลเซียส (isothermal)
split ratio	: 50 ต่อ1
ก๊าซตัวพา	: ก๊าซไนโตรเจนอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	: 1 ไมโครลิตร