บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์ และเคมีภัณฑ์

2.1.1 อุปกรณ์

เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น G-10 แบบ rotary ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., USA.

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KS-3000P ของบริษัท Kubota , Japan

เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Deckman, USA.

เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น L2200 P ของบริษัท Sartorius, Germany

เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น A200 S ของบริษัท Sartorius, Germany

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, USA.

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของบริษัท Shimadzu, Japan

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.

ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124 ของบริษัท ISSCO, USA.

ตู้อบไมโครเวฟ รุ่น ER-562 ของบริษัท Toshiba, Japan

ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Hearson, England

ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (incubater) ของบริษัท Memmert, Germany

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan

เครื่องหมัก (fermentor) รุ่น MD 300 ขนาด 5ลิตร และชุดควบคุมสภาวะ ของบริษัท L.E. Marubishi Co.,Ltd, Japan

เครื่องกาซโครมาโตกราฟี (gas chromatography) รุ่น HP5890 SeriesII ของบริษัท Hewlett Packard, USA.

เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography : HPLC) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan

2.1.2 เคมีภัณฑ์

โพลีเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรท ของบริษัท Sigma chemical company, USA.

คลอโรฟอร์ม ของบริษัท BDH, England

อะซีโตน ของบริษัท BDH, England

เอธานอล ของบริษัท E. Merck Damstadt, Germany

กรดซัลฟุริก ของบริษัท E. Merck Damstadt, Germany

ฟรุคโตส ของบริษัท E. Merck Damstadt, Germany

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ของบริษัท May & Baker laboratory chemical, England

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ของบริษัท E. Merck Damstadt, Germany

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท E. Merck Damstadt, Germany

โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Carlo erba, Italy

แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) ของบริษัท J.T. Baker, USA.

โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท Carlo erba, Italy

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E. Merck Damstadt, Germany

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E. Merck Damstadt, Germany

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ของบริษัท E. Merck Damstadt, Germany

ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$) ของบริษัท May & Baker laboratory chemical, England

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$) ของบริษัท E. Merck Damstadt, Germany

กรดบอริก (H_3BO_3) ของบริษัท E. Merck Damstadt, Germany

เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Carlo erba, Italy

โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ของบริษัท The Clorox company, USA.

สำหรับเคมีภัณฑ์ ซึ่งเป็นสารจำพวกอาหารเลี้ยงเชื้อ (media) อันได้แก่ ผงยีสต์สกัด, สารสกัดจากเนื้อ และเปปโตน เป็นของบริษัท Difco, USA. ส่วนโพลีเปปโตน เป็นของบริษัท Becton Dickinson, USA.

กากน้ำตาล (molasses) ได้รับการสนับสนุนจาก บริษัทสุราทิพย์ จำกัด

2.2 จุลินทรีย์

ใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สามารถสร้างและสะสมโพลีเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรท (PHB) ซึ่งได้คัดเลือกโดย อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) คือ *Alcaligenes* sp. A-04

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (stock culture medium) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15นาที (การนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน)

2.3.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed culture medium)

สูตรที่ 1 (nutrient broth ของ Difco) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

สูตรที่ 2 (Doi และคณะ,1986) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

ผงสกัดจากยีสต์	10	กรัม
โพลีเปปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม

ฟรุคโตส	10	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน (แยกสารละลายฟรุคโตสนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110°ซ เป็นเวลา 10 นาที)

สูตรที่ 3 (Doi และคณะ,1988) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

ผงสกัดจากยีสต์	10	กรัม
โพลีเปปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	5	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	5	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

2.3.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อการผลิต PHB

MSM (Mineral salt medium) สูตรปรับปรุง (อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์, 2536) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

แอมโมเนียมซัลเฟต	0.1	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.3	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.05	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	20.0	มก.
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	1.3	มก.
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	มก.
แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต	0.6	มก.
กรดบอริก	0.6	มก.
ผงสกัดจากยีสต์	0.1	กรัม
ฟรุคโตส	10.0	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3โมลาร์ แยกละลาย เกลือ,แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต และ trace element เมื่อละลายแล้วนำมารวมกัน ส่วนสารละลายฟรุคโตสนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110°ซ เป็นเวลา 15 นาที

2.4 <u>วิธีการเก็บรักษา การเตรียมหัวเชื้อ สำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ และการคัดเลือกอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ</u>

2.4.1 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อจุลินทรีย์มาปลูกลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) โดยใช้เข็มเขี่ย (needle) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชม. เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ และทำการปลูกเชื้อลงบนอาหารใหม่ (subculture) ทุก ๆ 1เดือน

2.4.2 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับกล้าเชื้อ

ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ จากเชื้อที่เก็บรักษาไว้ตามข้อ 2.4.1 ลงในสารละลายเกลือแกงเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์(physiological saline) นำเชื้อที่กระจาย(resuspend)ในสารละลายเกลือ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.35

2.4.3 การเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อ เพื่อให้ได้เชื้อเริ่มต้นปริมาณมาก

นำหัวเชื้อจากข้อ 2.4.2 จำนวน 0.5 มล. ใส่ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ สูตรที่ 1 2 และ3 ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มล. คิดเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 30 ชม. โดยเก็บตัวอย่างจากชั่วโมงที่ 18,24 และ 30 ชม. มาหาค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้น นำอาหารสูตรที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600นาโนเมตร และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด มาทำการเลี้ยงอีกครั้งหนึ่งที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 48 ชม. เก็บตัวอย่างทุก 6 ชม. นำตัวอย่างมาหาค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง นำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเติบโต เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมที่จะใช้สำหรับการเตรียมกล้าเชื้อต่อไป

2.5 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับการผลิต PHB หรือ การเตรียมกล้าเชื้อ

นำหัวเชื้อจากข้อ 2.4.2 ปริมาตร 0.5 มล. ใส่ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อที่เหมะสม ซึ่งคัดได้จากข้อ 2.4.3 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30°ซ โดยใช้เวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 2.4.3 นำกล้าเชื้อที่ได้มาปั่นแยกเอาส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อออก แล้วกระจายเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต PHB จากข้อ 2.3.3 แล้วถ่ายเชื้อลงในถังหมัก

2.6 การเปรียบเทียบการเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน เมื่อใช้อาหาร MSM และอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อสูตรที่เลือกไว้จากข้อ 2.4.3 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ

2.6.1 เปรียบเทียบการเติบโตและการผลิต PHB โดย *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อใช้อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อต่างกัน เลี้ยงในขวดเขย่า

นำหัวเชื้อจากข้อ 2.4.2 ปริมาณ 0.5 มล.ใส่ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อสูตรที่ได้เลือกไว้จากข้อ 2.4.3 และอาหาร MSM ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มล.เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ ใช้เวลาที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.3 จากนั้นถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อทั้งสองชนิดลงในขวดทดลองขนาด 250 มล. ที่มีอาหาร MSM อยู่ 50 มล.เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30°ซ เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง จนถึงชั่วโมงที่ 60 นำแต่ละตัวอย่างมาหาน้ำหนักเซลล์แห้งและ

ปริมาณ PHB

2.6.2 เปรียบเทียบการเติบโตและการผลิต PHB โดย *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อใช้อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อต่างกัน เลี้ยงในถังหมัก

นำหัวเชื้อจากข้อ 2.4.2 ปริมาณ 0.5 มล. ใส่ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อสูตรที่ได้เลือกไว้จากข้อ 2.4.3 และอาหาร MSM ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ โดยใช้เวลาที่เหมาะสมจากข้อ2.4.3จากนั้นถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อแต่ละชนิดลงในถังหมักที่มีอาหารMSM อยู่ 2.5 ลิตร เลี้ยงเชื้อโดยปรับอัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบ/นาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.8 vvm (Mulchandani และคณะ,1989) โดยปรับ pH (ค่าความเป็นกรดด่าง) เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 ชั่วโมง นำแต่ละตัวอย่างมาหาน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB

จากนั้นนำผลที่ได้จากข้อ 2.6.1 และ 2.6.2 มาเปรียบเทียบการเติบโตและการผลิต PHB เมื่อใช้อาหารสูตรที่เลือกจากข้อ 2.4.3 และอาหาร MSM เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ โดยเปรียบเทียบทั้งในขวดเขย่าและถังหมัก

2.7 <u>การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยการเลี้ยงแบบ Batch cultivation</u>

เตรียมกล้าเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมและเวลาการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.3 เก็บเซลล์โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง แล้วกระจายเซลล์ในอาหาร MSM สูตรปรับปรุง แล้วถ่ายลงสู่ถังหมัก ควบคุมอุณหภูมิที่ 30°ซ อัตราการกวน 600 รอบ/นาที และอัตราการให้อากาศ 1.8 vvm จากนั้นจึงศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีต่อการเพิ่มปริมาณเซลล์และปริมาณ PHB

2.7.1 การศึกษาผลของ pH ระหว่างการเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 เปรียบเทียบระหว่างสภาวะควบคุม pH ที่ 7.0 ตลอดการทดลอง โดยเติม 3M NaOH และ 1.5M H_2SO_4 (Mulchandani และคณะ ,1989) และสภาวะที่ไม่ควบคุม pH ตลอดการทดลอง โดยปรับค่า pH เริ่มต้นที่ 7.0 เมื่อใช้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้น 10.0 กรัม/ลิตร และแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต เป็น 0.1 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง 60 นำตัวอย่างมาหาความเข้มข้นของเซลล์ โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร หาน้ำหนักแห้งของเซลล์ ปริมาณฟรุคโตส (Bernfeld,1955) ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (Kempers, 1974) ปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ,1951; Mulchandani และคณะ,1989) และปริมาณ PHB (อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ ,2536 ;Brivonese และ Sutherland,1989)

2.7.2 การควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ระหว่างการเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30°ซ และใช้ค่า pH ที่เหมาะสม ที่ได้จากข้อ 2.7.1 แปรค่าอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ เพื่อให้ค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักแตกต่างกัน โดยเปรียบเทียบค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ตลอดการทดลอง กับค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักเท่ากับ 80 50 เปอร์เซ็นต์ และค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ ที่ชั่วโมงที่ 0 และปรับค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ชั่วโมงที่ 12 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาหาความเข้มข้นของเซลล์ โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร น้ำหนักแห้งของเซลล์ ปริมาณฟรุคโตส ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณโปรตีนและปริมาณ PHB

2.7.3 การหาปริมาณของฟรุคโตส (อาหารแหล่งคาร์บอน) ที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิต PHB

เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30°ซ

และใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.7.1 และ 2.7.2 แปรผันปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นคือ 5.0 10.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 60ชั่วโมง แล้วนำแต่ละตัวอย่างมาหาความเข้มข้นของเซลล์ โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600นาโนเมตร น้ำหนักแห้งของเซลล์ ปริมาณฟรุคโตส ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณโปรตีนและปริมาณ PHB

2.7.4 การหาปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟต (อาหารแหล่งไนโตรเจน) ที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิต PHB

เลี้ยงเชื้อ*Alcaligenes*sp.A-04 โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.7.1 2.7.2 และ 2.7.3 แปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นคือ 0.1 0.3 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 กรัม/ลิตร โดยให้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ10.0กรัม/ลิตร จากนั้นจึงเพิ่มปริมาณฟรุคโตสเป็น 20.0 และ 30.0กรัม/ลิตร เพื่อให้เพียงพอสำหรับ *Alcaligenes* sp. A-04 ที่จะใช้เมื่อเพิ่มปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเก็บตัวอย่างทุก12ชั่วโมงเป็นเวลา 60 ชั่วโมง นำแต่ละตัวอย่างมาหาความเข้มข้นของเซลล์โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร น้ำหนักแห้งของเซลล์ ปริมาณฟรุคโตส ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณโปรตีนและปริมาณ PHB

2.8 <u>ศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูก ได้แก่กากน้ำตาลเพื่อลดต้นทุนในการผลิต</u>

2.8.1 การเลือกปริมาณของกากน้ำตาลที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นอาหารแหล่งคาร์บอนสำหรับการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 เพื่อผลิต PHB

เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.3 เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์และกระจายเซลล์ ในสารละลายเกลือแกง 0.85 เปอร์เซ็นต์ นำมา 1 มล. ถ่ายลงในอาหาร MSM สูตรปรับปรุง ซึ่งมีกากน้ำตาล 10 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นอาหารแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 50 มล. บรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ

30°ซ เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB

2.8.2 การหาปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟต ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสำหรับการผลิต PHB

2.8.2.1 ใช้กากน้ำตาล 20 เปอร์เซ็นต์เป็นอาหารแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30°ซ และใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.7.1 และ 2.7.2 แปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นคือ 0.1 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 84 ชั่วโมง นำแต่ละตัวอย่างมาหา น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาล (กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส) ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณโปรตีนและปริมาณ PHB

2.8.2.2 ใช้กากน้ำตาล 30 เปอร์เซ็นต์เป็นอาหารแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30°ซ และใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.7.1 และ 2.7.2 ใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 1.5 กรัม/ลิตร เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 84 ชั่วโมง นำแต่ละตัวอย่างมาหา น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาล (กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส) ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณโปรตีนและปริมาณ PHB

2.8.2.3 ใช้กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส ที่บริสุทธิ์เป็นอาหารแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30°ซ และใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จาก 2.7.1 และ 2.7.2 แปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 0.1 และ 0.5 กรัม/ลิตร ให้ปริมาณกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส เท่ากับปริมาณของกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส ในกากน้ำตาล 20% หลังจากใส่ในถังหมัก เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 84 ชั่วโมง นำแต่ละตัวอย่างมาหา น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาล (ทั้ง 3 ชนิด) ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณโปรตีนและปริมาณ PHB

2.9 การปรับปรุงวิธีการเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์และเพิ่มการผลิต PHB โดยการเลี้ยงแบบ Fed-batch cultivation

เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ใช้สภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 2.7 โดยแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตจนถึงระดับที่ปริมาณฟรุคโตส (ในสภาวะควบคุม 10.0 กรัม/ลิตร) ไม่เพียงพอที่จะใช้ในการเติบโตตลอดระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ จึงได้ทดลองเติมแหล่งอาหารที่สำคัญลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเพิ่มการเติบโต และการผลิต PHB

2.9.1 การเพิ่มการเติบโตและการผลิต PHB โดยการเติมฟรุคโตส

ก.) เลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 0.5 กรัม/ลิตร ฟรุคโตส 10.0 กรัม/ลิตร สภาวะในการเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับข้อ 2.7 ที่ชั่วโมงที่ 42 เติมฟรุคโตสให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นเริ่มต้น เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 84 ชั่วโมง รวมทั้งช่วงเวลาก่อนและหลังเติมฟรุคโตส นำมาหาความเข้มข้นของเซลล์โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร น้ำหนักแห้งของเซลล์ ปริมาณฟรุคโตส ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณโปรตีนและปริมาณ PHB

ข.) เลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 1.0 กรัม/ลิตร ฟรุคโตสเริ่มต้น 10.0 กรัม/ลิตร และสภาวะที่เหมาะสม เช่นเดียวกับข้อ 2.7 ที่ชั่วโมงที่ 18 เติมฟรุคโตสให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นเริ่มต้น เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 84 ชั่วโมง รวมทั้งที่เวลาก่อนเติมและหลังเติมฟรุคโตส นำมาหาความเข้มข้นของเซลล์ โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร น้ำหนักแห้งของเซลล์ ปริมาณฟรุคโตส ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณโปรตีนและปริมาณ PHB

2.9.2 การเพิ่มการเติบโตและการผลิต PHB โดยการเติมฟรุคโตสและแอมโมเนียมซัลเฟต

ก.) เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 1.0 กรัม/ลิตร ฟรุคโตสเริ่มต้น 10.0 กรัม/ลิตร และสภาวะที่เหมาะสม เช่นเดียวกับข้อ 2.7 ที่ชั่วโมงที่ 18 เติมฟรุคโตสให้ได้ความเข้มข้นในถังหมักเท่ากับ 20.0 กรัม/ลิตร และเติมแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ความเข้มข้นในถังหมักเท่ากับ 1.0 กรัม/ลิตร เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 84 ชั่วโมง รวมทั้งช่วงเวลาก่อนเติมและหลังเติม ฟรุคโตสและแอมโมเนียมซัลเฟต นำมาหาความเข้มข้นของเซลล์ โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรุคโตส ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณโปรตีนและปริมาณ PHB

ข.) เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 1.0 กรัม/ลิตร ฟรุคโตสเริ่มต้น 10.0 กรัม/ลิตร และสภาวะที่เหมาะสมเช่นเดียวกับข้อ 2.7 ที่ชั่วโมงที่ 18 เติมฟรุคโตสให้ได้ความเข้มข้นในถังหมักเท่ากับ 20.0 กรัม/ลิตร และเติมแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ความเข้มข้นในถังหมักเท่ากับ 1.5 กรัม/ลิตร เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 84 ชั่วโมง รวมทั้งช่วงเวลาก่อนเติมและหลังเติม ฟรุคโตสและแอมโมเนียมซัลเฟต นำมาหาความเข้มข้นของเซลล์ โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรุคโตส ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณโปรตีน และปริมาณ PHB

2.9.3 การเพิ่มการเติบโต และการผลิต PHB โดยการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต

เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 1.5 กรัม/ลิตร ฟรุคโตสเริ่มต้น 30.0 กรัม/ลิตร และสภาวะที่เหมาะสม เช่นเดียวกับข้อ 2.7 ที่ชั่วโมงที่ 24 เติมแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ความเข้มข้น 1.0 กรัม/ลิตร เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 84 ชั่วโมง รวมทั้งที่เวลาก่อนเติมและหลังเติม แอมโมเนียมซัลเฟต นำมาหาความเข้มข้นของเซลล์โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรุคโตส ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณโปรตีนและปริมาณ PHB

2.10 วิธีหาค่าความเข้มข้นของเซลล์ โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร วิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และกราฟมาตราฐานระหว่าง น้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของเซลล์

2.10.1 วิธีหาค่าความเข้มข้นของเซลล์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร นำน้ำหมักที่เก็บจากถังหมักในแต่ละช่วงเวลามาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ค่า OD_{600} (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.1 ถึง 0.5 แล้วบันทึกค่าไว้ นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับ กราฟมาตรฐานระหว่าง น้ำหนักเซลล์แห้งและ OD_{600} (ภาคผนวกที่ 1ก. และ 1ข.) จากนั้นนำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยใช้สูตรดังนี้

น้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./มล.) = (1/ความชัน) x OD_{600} x ค่าการเจือจาง (dilution)

2.11 วิธีหาปริมาณฟรุคโตสในน้ำหมัก

ใช้วิธีของ Bernfeld(1955) โดยนำน้ำหมักที่ทำการปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว ปริมาณ 1 มล. เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylic acid : DNSA reagent) (ภาคผนวกที่ 2) 1 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่น 10 มล.ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่าง ฟรุคโตสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (ภาคผนวกที่ 5) จากนั้นนำมาหาปริมาณฟรุคโตสโดยใช้สูตรดังนี้

ปริมาณฟรุคโตส (มก./มล.) = (1/ความชัน) x OD_{540} x ค่าการเจือจาง

2.12 วิธีหาปริมาณ residual biomass (ชีวมวลส่วนที่เหลือ)

หาได้จาก นำปริมาณ PHB ลบออกจาก น้ำหนักเซลล์แห้ง มีหน่วยเป็น กรัม/ลิตร

2.13 วิธีหาปริมาณโปรตีนของเซลล์ (cellular protein)

ใช้วิธีของ Lowry และคณะ (1951) และ Mulchandani และคณะ (1989) โดยนำน้ำหมักปริมาณ 5 มล. มาปั่นแยกส่วนน้ำใสออก แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 N จำนวน 5 มล. นำไปอุ่นที่ 90°ซ เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมนำสารละลายโปรตีนที่เจือจางแล้วปริมาณ 1 มล. เติมสารละลาย Lowry C (ภาคผนวกที่ 3) 5 มล. ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วเติมสารละลาย Lowry D (ภาคผนวกที่ 3) 0.5 มล.ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่าง ปริมาณโปรตีน (BSA, bovine serum albumin) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร (ภาคผนวกที่ 6) จากนั้นนำมาหาปริมาณโปรตีนโดยใช้สูตรดังนี้

ปริมาณโปรตีน (มก./มล.) = (1/ความชัน) x (1/1000) x OD_{660} x ค่าการเจือจาง

2.14 วิธีหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก

ใช้วิธีของ Kempers (1974) โดยนำน้ำหมักที่ทำการปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำน้ำหมักที่เจือจางแล้วปริมาณ 5 มล. เติมโปแตสเซียมคลอไรด์ (ภาคผนวกที่ 4) เข้มข้น 2 โมลาร์ 5 มล.เติมสารละลาย EDTA (ภาคผนวกที่ 4) 1 มล. ผสมให้เข้ากันแล้ววางทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นเติมฟีนอลไนโตรพัสซายด์รีเอเจนท์ (ภาคผนวกที่ 4) 2 มล. เติมบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรท์รีเอเจนท์ (ภาคผนวกที่ 4) 4 มล. และเติมน้ำกลั่นปลอดประจุ 8 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจน (NH_4^+-N) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร (ภาคผนวกที่ 7) จากนั้นนำมาหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต โดยใช้สูตรดังนี้

ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (มก./มล.) = $OD_{๐๖๐}$ x (1/ความชัน) x (1/1000)

x (ค่าการเจือจาง/5) x (132/28)

28 คือ น้ำหนักโมเลกุลของธาตุไนโตรเจน ในแอมโมเนียมซัลเฟต

132 คือ น้ำหนักโมเลกุลของแอมโมเนียมซัลเฟต

2.15 วิธีการสกัดแยก PHB จากเซลล์

การสกัดแยก PHB (เป็นวิธีการที่ปรับปรุงจากวิธีของ Brivonese และ Sutherland, 1989 โดย อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ ,2536) โดยนำน้ำหมักปริมาตร 5 มล. ใส่ในหลอดแก้วมีฝาเกลียวปิดขนาด 10 มล. นำไปปั่นแยกที่ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 25 นาที เก็บส่วนของเซลล์ไว้ แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ หรือ คลอรอกซ์ (clorox) 1 มล. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นเติมน้ำกลั่น 4 มล. ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นที่ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วยอะซีโตน 5 มล. แล้วปั่นล้างเอาอะซีโตนออก จากนั้นเอาส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วยเอทธานอลบริสุทธิ์ 99.80% 5 มล. แล้วปั่นล้างด้วยอัตราเร็วเท่าเดิม เอาเอทธานอลออกเก็บส่วนของตะกอนไว้ เติมคลอโรฟอร์ม 5 มล. ต้มในน้ำเดือด 30 วินาที ทิ้งไว้ให้เย็นนำไปปั่นเก็บส่วนใสไว้ นำส่วนที่เป็นตะกอนไปสกัด PHB อีกครั้ง รวมส่วนใสที่ได้กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ปรับปริมาตรของส่วนใสที่กรองได้ให้ครบ 10 มล. PHB จะละลายอยู่ในคลอโรฟอร์มเก็บส่วนนี้ (stock ของ PHB) นำส่วนนี้ไปวิเคราะห์ปริมาณ PHB ต่อไป

2.16 การวิเคราะห์ปริมาณ PHB ที่สกัดแยกได้

นำสารละลาย PHB ที่สกัดได้ในข้อ 2.15 มาเจือจาง ด้วยคลอโรฟอร์มในอัตราส่วนที่เหมาะสม แล้วแบ่งมา 0.1 มล. ใส่ในหลอดทดลอง อบให้แห้งในตู้อบ 80°ซ 10 นาที เพื่อให้ส่วนของคลอโรฟอร์มระเหยหมด นำส่วนของ PHB ที่อยู่ในหลอดมาเติมด้วยกรดซัลฟุริกเข้มข้น 3 มล. ต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวนหาปริมาณ PHB โดยเปรียบเทียบกับความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ PHB มาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร ซึ่งคำนวนเป็นกรัมของ PHB ได้โดยใช้สมการข้างล่างดังนี้

PHB (กรัม/น้ำหมัก 1 ลิตร) = OD_{235} x 1/slope x 3 -------- PHB เป็นไมโครกรัมในกรดซัลฟุริก 3 มล.หรือในคลอโรฟอร์มที่เจือจาง 0.1 มล. (1)

= (1) x 1/0.1 x dilution x 10 -------- (2) PHB เป็นไมโครกรัมในstock ของPHB 10มล.

= (2) x $1/10^6$ ---------- PHB เป็นกรัมใน stock ของ PHB 10 มล. หรือปริมาณ PHB จากน้ำหมัก 5 มล. (3)

= (3) x 1/5 x 1000 ---------- ปริมาณของ PHB คิดเป็น กรัม/ลิตร (ของน้ำหมัก)

โดยที่ 1/slope ได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ PHB มาตรฐาน และค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร (ภาคผนวกที่ 8)

2.17 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลในกากน้ำตาล ด้วยเครื่องลิควิดโครมาโตรกราฟี

เมื่อเก็บตัวอย่างแต่ละช่วงเวลามาแล้ว นำไปปั่นแยกเอาเซลล์ออกที่ 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเอาส่วนน้ำใสที่ได้ ไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน จากนั้นนำส่วนที่กรองได้ไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์หาน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตสและซูโครส โดยเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลทั้ง3ชนิด กับกราฟมาตรฐานระหว่างขนาดของ peak (peak area) และปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิด (ภาคผนวกที่ 9ก. 9ข. และ 9ค.) พร้อมกันนี้ได้แสดงโครมาโตแกรมของน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส จากกากน้ำตาล เปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส มาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 10)

ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC มีอุปกรณ์ และสภาวะต่าง ๆ ดังนี้

คอลัมน์ : Phenomenax Spherisorb NH_2

Detector : Refractive index detector

flow rate : 2 มล./นาที

Mobile phase : 75% acetonitrile in H_2O

ปริมาณสารตัวอย่าง : 20 ไมโครลิตร

อุณหภูมิ : อุณหภูมิห้อง

I22359989