บทที่ 3

วิธีการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้แบ่งการดำเนินงานออกเป็น 4 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ดำเนินการศึกษาผลของค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเส้นใยเซลลูโลสจากเปอร์เซ็นต์ผลได้ (%Yield) ของการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเซลลูโลส รวมทั้งศึกษามวลและความหนาของเยื่อบางเซลลูโลส ขั้นตอนสุดท้ายทำการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลและความหนาแน่นของแบคทีเรียระหว่างการเพาะเลี้ยง

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาผลการเหนี่ยวนำเซลล์ด้วยไฟฟ้าที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ในขั้นตอนนี้จะศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้อง คือ เวลา สนามไฟฟ้า และความถี่ ตามลำดับ โดยวัดปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเพาะเลี้ยงระหว่างการเพาะเลี้ยง และยืนยันเงื่อนไขที่ได้ด้วยความหนาแน่นของแบคทีเรียและปริมาณน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงอีกครั้ง

ขั้นตอนที่ 3 ดำเนินการเตรียมเยื่อบางเซลลูโลสด้วยเงื่อนไขค่าพีเอช และการเหนี่ยวนำเซลล์ด้วยไฟฟ้าที่เหมาะสมจากขั้นตอนที่ 1 และขั้นตอนที่ 2 ตามลำดับ โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน

ขั้นตอนที่ 4 ทดสอบเยื่อบางเซลลูโลสที่เตรียมได้ ซึ่งแบ่งเยื่อบางออกเป็น 2 ชุด คือ ชุดควบคุม (CC4S) และชุดเหนี่ยวนำเซลล์ด้วยไฟฟ้า (CE4S)

โดยทุกขั้นตอนจะมีวัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการดังนี้

3.1 วัสดุ

3.1.1 น้ำตาลซูโครส (Sucrose, มิตรผล)

3.1.2 เปปโตส (Peptose, Becton Dickinson)

3.1.3 Yeast extract (Becton Dickinson)

3.1.4 Na_2HPO_4 (Riedel-de Haën)

3.1.5 กรดซิตริก (Citric acid, วิทยาศรม)

3.1.6 Agar (Merck)

3.1.7 กรดไฮโดรคลอริก (HCl, Merck)

3.1.8 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH, AR Grade, Merck)

3.1.9 สารละลายเอทธานอล (99.8%, Liquor Distillery Organization)

3.1.10 สารละลายเมทธานอล (99.0%,วิทยาศรม)

3.1.11 Poly Ethylene Glycol (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 20 35 100 และ 200 kDa

3.1.12 แบเรียมคลอไรด์ ($BaCl_2$, Sharlau)

3.1.13 ไอโอดีน (I_2 , Sharlau)

3.1.14 โปแตสเซียมไอโอไดด์ (KI, Sharlau)

3.1.15 น้ำกลั่น

3.1.16 กระดาษฟลอยด์

3.1.17 แผ่นนิกเกิล 99.0% (Advent, England)

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 เครื่องแก้วสำหรับการเพาะเลี้ยง เช่น จานแก้ว (petridish) บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดแก้ว แท่งแก้วคน หลอดหยด

3.2.2 Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.2.3 เครื่อง centrifuge (Denver Instrument, Force7)

3.2.4 ปิเปต ขนาด 0.5 1 และ 5 มิลลิลิตร

3.2.5 ไมโครปิเปต (Nichiryo, model 50000DG)

3.2.6 ช้อนสำหรับตวง

3.2.7 พีเอชมิเตอร์ (pH meter; Densor, Model 20)

3.2.8 เครื่องวัดปริมาณน้ำตาล (ERMA, REF513)

3.2.9 เครื่องชั่งระบบดิจิตอลแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler, PL400)

3.2.10 เครื่องชั่งระบบดิจิตอลแบบทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Sartorius, RP310 S)

3.2.11 ปากคีบปลายแบนและปลายแหลม (forcep)

3.2.12 ตู้อบ (Memert, model 400)

3.2.13 เครื่องนึ่งความดันสูง (autoclave; Hirayama, H43D)

3.2.14 ไมโครมิเตอร์

3.2.15 นาฬิกาจับเวลา (casio, HS-5)

3.2.16 เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้ากระแสสลับ (Function generator, Model DS340)

3.2.17 เครื่องออสซิสโลสโคป (Oscilloscpoe รุ่น ss-7802A 20 MHz, Iwatsu)

3.2.18 เครื่องขยายสัญญาณไฟฟ้า (Differential Amplifier)

3.2.19 สายโคแอกเชียล

3.2.20 ลวดเงินขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.35 มิลลิเมตร

3.2.21 Calomel electrode 1 คู่ (Activon, AEP111 single junction reference probes)

3.2.22 Chamber สำหรับประกอบเยื่อบางเพื่อวัดสมบัติทางไฟฟ้าของเยื่อบาง

3.2.23 ระบบทดสอบแบบปิดตาย

3.2.24 เครื่องกวนแบบให้ความร้อน (Hot plate with stirrer; Heidolph, PL 400)

3.2.25 เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometers, Spectronic® 20^+ series)

3.2.26 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JEOS JSM, Model 5800LV)

3.2.32 ถาดพลาสติกขนาด 20 × 30 เซนติเมตร

3.2.33 หลอดไฟยูวี (Sankyo Denki Germicidal Lamp)

3.3 วิธีดำเนินการ

3.3.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

สูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียดัดแปลงจากสูตรอาหาร HS ซึ่งประกอบด้วย 4% (w/v) sucrose, 0.5%(w/v) peptone, 0.5%(w/v) yeast extract, 0.033%(w/v) Na_2HPO_4 และ 0.0115%(w/v) citric acid โดยปรับค่าพีเอชตามที่ต้องการด้วย HCl 1.94 N หรือ NaOH 1.5 N (Dubey V., et al., 2002) จากนั้นนำไปนึ่งในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 115 ปอนด์ตารางนิ้ว$^{-1}$ อุณหภูมิ 121^0 C เป็นเวลา 15 นาที (Naritomi T., et al.,1998) ตั้งทิ้งไว้จนเย็น เทอาหารเพาะเลี้ยงปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในจานแก้ว (petridish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีเดียวกัน แล้ววางในตู้ที่เช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70%(v/v) และเปิดแสงยูวี (30 Watt, Sankyo Denki Germicidal Lamp) นาน 1 ชั่วโมงก่อนการเพาะเลี้ยงทุกการทดลองใช้แบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ที่มีความหนาแน่นเซลล์ 1×10^6 cfu ml^{-1} (ดูวิธีการหาความหนาแน่นของแบคทีเรียในภาคผนวก ข) เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 27.0 ± 2.4 โดยให้แสง 1,000 ลักซ์ นาน 12 ชั่วโมงวัน$^{-1}$

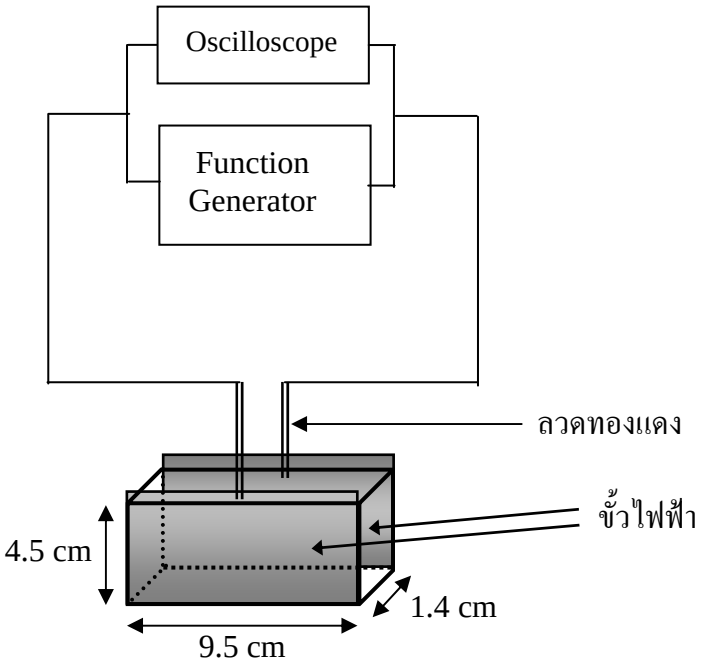
3.3.2 การหาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลส

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียตามวิธีการในหัวข้อ 3.3.1 โดยผันแปรค่าพีเอชระหว่าง 3.0-8.0 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ผลได้ (%Yield) การใช้ปริมาณน้ำตาล มวลและความหนาของแผ่นเซลลูโลสที่แบคทีเรียผลิต โดยเก็บเกี่ยวผลผลิตทุก ๆ 3 วันจนกระทั่งอาหารเพาะเลี้ยงแห้งหมด

เปอร์เซ็นต์ผลได้หาจากอัตราส่วนระหว่างมวลรวมที่เก็บเกี่ยวได้กับมวลของน้ำตาลเริ่มต้น ในที่นี้คือน้ำตาลซูโครสที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง โดยมีมวลรวม 2 กรัมในอาหารเพาะเลี้ยง 50 มิลลิลิตร (ดูการคำนวณในภาคผนวก ค) หลังจากศึกษาในเบื้องต้นแล้ว ได้เลือกช่วงพีเอชที่แคบลงเพื่อทำการทดลองซ้ำหาค่าพีเอชที่เหมาะสมเพียงค่าเดียว

3.3.3 วิธีการเหนี่ยวนำเซลล์ด้วยไฟฟ้า

ประกอบอุปกรณ์เพื่อการเหนี่ยวนำเซลล์ทำนองเดียวกับวิธีการของอมรรัตน์ (2546) แต่ขยายให้ใหญ่ขึ้นเป็น 1.4 × 9.5 × 4.5 เซนติเมตร ซึ่งสามารถบรรจุแบคทีเรียได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ส่วนขั้วไฟฟ้าทำด้วยนิกเกิล 99.0 % (Advent, England) หนา 0.25 มิลลิเมตรมีลักษณะเป็นแผ่นระนาบจำนวน 2 แผ่นวางขนานกัน ให้มีระยะห่างระหว่างแผ่นขนาน 1.4 เซนติเมตร แล้วต่อขั้วไฟฟ้าแผ่นขนานเข้ากับต้นกำเนิดสัญญาณไฟฟ้ากระแสสลับที่ผันแปรศักย์ไฟฟ้าและความถี่สัญญานไฟฟ้าได้ การทดลองนี้ได้ใช้ออสซิลโลสโคปตรวจสัญญาณไฟฟ้าที่ให้แก่เซลล์ตลอดช่วงการเหนี่ยวนำ ภาพประกอบที่ 3.1 แสดงการต่ออุปกรณ์เพื่อการเหนี่ยวนำเซลล์



ภาพประกอบที่ 3.1 การต่ออุปกรณ์ทางไฟฟ้าเพื่อการเหนี่ยวนำเซลล์

3.3.4 การหาเงื่อนไขเวลา สนามไฟฟ้า และความถี่ของสัญญาณไฟฟ้าที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลส

ทำการเหนี่ยวนำแบคทีเรียตามวิธีการในหัวข้อ 3.3.3 ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีค่าพีเอชที่เลือกจากผลที่ได้จากวิธีการในหัวข้อ 3.3.2 โดยขั้นต้นได้ใช้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ 7.5 V_{p-p} เท่ากับที่พบในเซลล์ยีสต์ (อมรรัตน์, 2546) ที่ทำให้เซลล์ยีสต์มีการใช้น้ำตาลในปริมาณมาก ใช้ความถี่คงที่ 0.5 MHz และผันแปรเวลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำเซลล์ระหว่าง 1-10 นาทีก่อนการเพาะเลี้ยงนำเซลล์ที่เหนี่ยวนำแล้วไปเพาะเลี้ยงตามวิธีการในหัวข้อ 3.3.1 ศึกษาผลที่ได้โดยการวัดปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเพาะเลี้ยง โดยคาดว่าปริมาณน้ำตาลที่ลดลงจะสัมพันธ์กับการผลิตเซลลูโลสของเซลล์ เมื่อได้เวลาเหมาะสมที่ทำให้น้ำตาลลดลงเร็วที่สุดแล้ว จึงศึกษาปัจจัยทางด้านสนามไฟฟ้าและความถี่ด้วยวิธีเดียวกันกับเวลา โดยค่าศักย์ไฟฟ้าผันแปรระหว่าง 1-7.5 V_{p-p} และค่าความถี่ผันแปรระหว่าง 10^2-10^6 Hz นอกจากจะศึกษาโดยใช้ปริมาณน้ำตาลที่ลดลงเป็นตัวบ่งชี้แล้ว ได้วิเคราะห์หาความหนาแน่นเซลล์เพื่อเป็นการตรวจสอบอีกทางหนึ่ง

3.3.5 การเตรียมเยื่อบาง

หลังจากศึกษาได้เงื่อนไขที่เหมาะสมของค่าพีเอชตามหัวข้อ 3.3.2 และเงื่อนไขการเหนี่ยวนำเซลล์ (เวลา ศักย์ไฟฟ้า และความถี่) ตามหัวข้อ 3.3.4 ได้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียตามวิธีการในหัวข้อ 3.3.1 นำแผ่นเซลลูโลสที่แบคทีเรียผลิตได้ 3 วัน ไปต้มในน้ำกลั่นที่อุณภูมิ 90 ^oC เพื่อให้แบคทีเรียตาย (Evans B.R., et al., 2003) แล้วแช่ในสารละลาย NaOH 1.5 N เป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องเฉลี่ย 27 ^oC เพื่อขจัดเซลล์ในแผ่นเซลลูโลสตามวิธีการของ Toda K., et al. (1997) หลังจากนั้นนำแผ่นเซลลูโลสที่ได้ล้างในน้ำกลั่น จนกระทั่งน้ำล้างมีค่าพีเอชเท่ากับน้ำกลั่น (พีเอช 6.7) นำไปแช่ใน HCl 1.94 N นาน 1 ชั่วโมงเพื่อปรับสภาพของแผ่นเซลลูโลส แล้วนำแผ่นเซลลูโลสไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37^oC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในการนี้น้ำหนักของแผ่นเซลลูโลสหายไป 99.0 % จะเรียกเยื่อบางที่ผลิตได้จากเงื่อนไขพีเอชที่เหมาะสมในหัวข้อ 3.3.2 ว่าเยื่อบางชุดควบคุม (CC4S) และเรียกเยื่อบางที่ผลิตได้จากเงื่อนไขการเหนี่ยวนำเซลล์ในหัวข้อ 3.3.4 ว่าเยื่อบางชุดเหนี่ยวนำ (CE4S)

3.3.6 การศึกษาขนาดรูและความพรุนของเยื่อบาง

เยื่อบางชุดควบคุม (CC4S) และเยื่อบางชุดที่เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้า (CE4S) ถูกนำไปศึกษาขนาดรู โดยใช้โปรแกรมคาร์นอย (Carnoy Software) วิเคราะห์หาขนาดรูของเยื่อบางบนพื้นที่ของภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron

Microscope, SEM) โดยจะป้อนขนาดของพื้นที่ให้โปรแกรมทำการวิเคราะห์ขนาดรู โดยอาศัยจุดดำบนภาพ จากนั้นก็จะคำนวณพื้นที่ทั้งหมดของรู โปรแกรมนี้สามารถปรับสีของภาพเพื่อให้จุดดำต่างจากสีของพื้นที่เยื่อบางอย่างชัดเจน นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างความถี่ของจำนวนรูและขนาดรู จะได้ภาพการกระจายของรูบนเยื่อบางในพื้นที่ที่เลือก ส่วนความพรุนหาได้จากสมการที่ 3.1 เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องยิ่งขึ้น ควรถ่ายภาพที่มีกำลังขยายไม่สูงจนเกินไป เพื่อได้ภาพถ่ายที่มีพื้นที่มากพอ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ใช้กำลังขยายที่ 30,000 X

$$\text{Porosity} = (A_p / A_m) \times 100 \qquad (3.1)$$

เมื่อ A_p คือ พื้นที่รูพรุนของเยื่อบาง

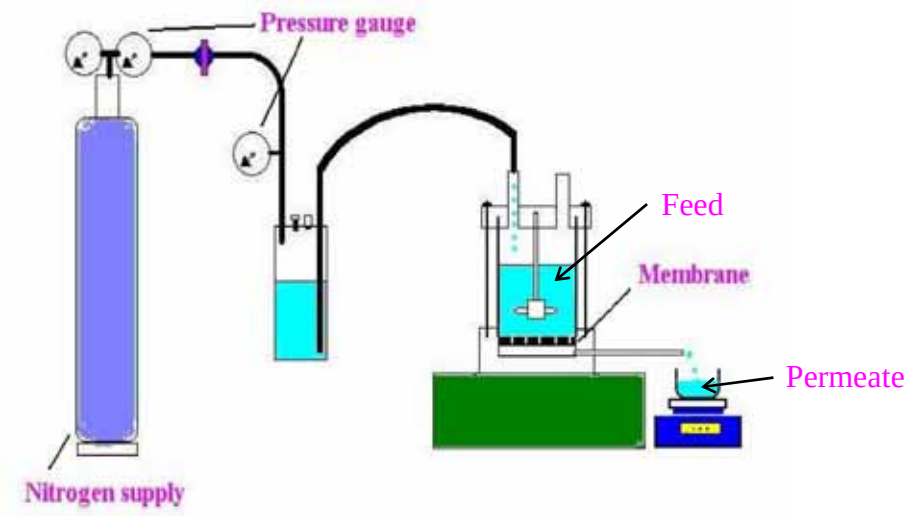
A_m คือ พื้นที่ทั้งหมดของเยื่อบาง ซึ่งการทดลองนี้ใช้ค่าคงที่ 14.3 μm^2

3.3.7 การหาเปอร์เซ็นต์การบวมน้ำของเยื่อบาง

ตัดเยื่อบางเป็นแผ่นสี่เหลี่ยมขนาด 1×1 เซนติเมตร นำไปชั่งน้ำหนักของเยื่อบางขณะแห้งแต่ละแผ่นแล้วบันทึกผล แล้วแช่เยื่อบางในน้ำกลั่น สุ่มตัวอย่างเยื่อบางทุก ๆ 1 นาทีซับน้ำด้วยกระดาษกรอง นำไปชั่งหามวลของเยื่อบางแล้วบันทึกผล ผลต่างระหว่างมวลทั้งสองค่านำไปหาเปอร์เซ็นต์การบวมน้ำจากสมการ 2.1

3.3.8 การหาสภาพให้ซึมผ่านของน้ำ (Hydraulic permeability)

ใช้วิธีเดียวกันกับ Wanichapichart P. และคณะ (2002) กล่าวคือ แช่เยื่อบางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.7 เซนติเมตรในน้ำกลั่น จนกระทั่งเยื่อบางบวมน้ำสูงสุด (ตามข้อมูลจากหัวข้อ 3.3.7) แล้วจัดเยื่อบางลงในอุปกรณ์ทดสอบแบบปิดตาย ดังภาพประกอบที่ 3.2 ค่อย ๆ เพิ่มความดันจาก 50 - 250 kPa แต่ละความดันบันทึกมวลน้ำที่ผ่านเยื่อบางทุก ๆ 3 นาที คำนวณค่าเพอมิเอทฟลักซ์ในหน่วย L m^{-2} h^{-1} เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเพอมิเอทฟลักซ์ (J) กับความดัน (P) ความชันของกราฟคือค่าสภาพให้ซึมผ่านของน้ำ (L_p) ตามที่กล่าวไว้ในสมการ 2.2



ภาพประกอบที่ 3.2 แสดงอุปกรณ์ชุดทดสอบการกรองแบบปิดตาย

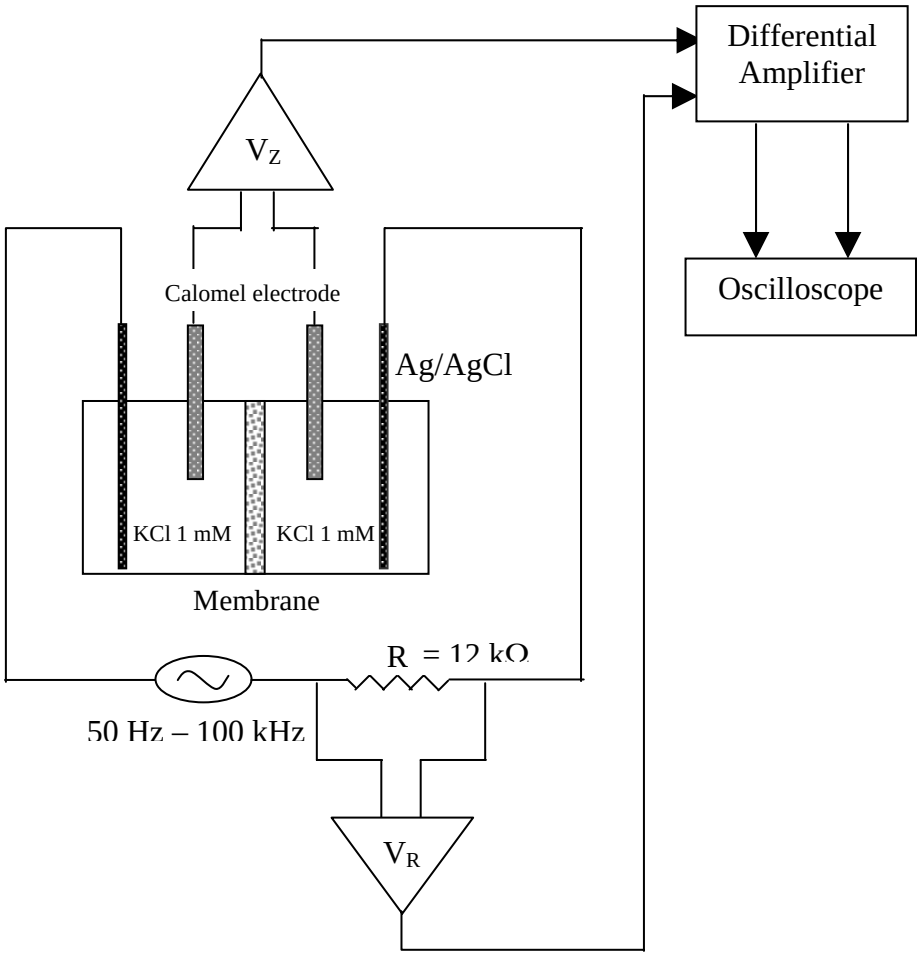
3.3.9 การหา MWCO ของเยื่อบางเซลลูโลส

งานวิจัยนี้ใช้ PEG ทดสอบการกักกันเพื่อหาค่า MWCO โดยกรองสารละลาย PEG ที่ความเข้มข้น 50 ppm. (Sabde A.D., et al., 1997) น้ำหนักโมเลกุล 20 35 100 และ 200 kDa ใช้ความดันคงที่ 100 kPa (Sabde A.D., et al., 1997) ในระบบการกรองแบบปิดตาย (หัวข้อ 3.3.8) แล้ว หาความเข้มข้นของ PEG ในเพอมิเอทด้วยวิธี Spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 535 nm (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ง) นำค่ามาคำนวณเปอร์เซ็นต์การกักกัน PEG โดยอาศัยสมการ 2.3

3.3.10 การศึกษาด้วยวิธีอิมพีแดนซ์สเปคโตรสโคปี

จัดเยื่อบางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.7 เซนติเมตรในอุปกรณ์ดังภาพประกอบที่ 3.3 เติมสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 1 mM ลงในช่องทั้งสองด้าน ต่อปลายทั้งสองของ Calomel electrode (Hg_2Cl_2) เข้ากับ Differential Amplifier เพื่อวัดศักย์ไฟฟ้าของเยื่อบางในสารละลายดังกล่าว โดยมีตัวต้านทาน (R=12 kΩ) ต่ออนุกรมกับระบบวัด เพื่อสามารถคำนวณกระแสของวงจรได้และใช้ Ag/AgCl เป็นตัวจ่ายสัญญาณไฟฟ้าให้แก่ระบบวัด ป้อนสัญญาณไฟฟ้าที่ความถี่ระหว่าง 50 Hz-100 kHz จาก Function Generator แล้ววัดค่าศักย์ไฟฟ้า V_R V_m และผลต่างมุมเฟส ($\Delta\phi$) ระหว่างศักย์ไฟฟ้าทั้งสองจากช่องสัญญาณที่ 1 และช่องสัญญาณที่ 2 ของOscilloscope คำนวณค่าอิมพีแดนซ์ (Z) สภาพนำไฟฟ้า (G_{eff}) และความจุทางไฟฟ้า (C_{eff})

ของเยื่อบางจากสมการ 2.5 และ 2.6 แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Z G_{eff} C_{eff} กับความถี่ (f) ของสัญญาณป้อน



ภาพประกอบที่ 3.3 การจัดวางอุปกรณ์การวัดค่าอิมพีแดนซ์ (Z) สภาพนำไฟฟ้า (G_{eff}) และความจุทางไฟฟ้า (C_{eff}) ของเยื่อบางโดยใช้กระแสไฟฟ้าสลับ