บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. จุลินทรีย์

ในการทดลองใช้เชื้อ *Ralstonia eutropha* TISTR 1095 สั่งซื้อจากศูนย์เก็บรวบรวมจุลินทรีย์ (MIRCEN) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

Ralstonia eutropha TISTR 1095 จะถูกเก็บรักษาในอาหารวุ้นเอียง (Nutrient agar slant) และใช้อาหารเหลว (Nutrient broth) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นโดยใช้สูตรอาหารของ Yan และคณะ (2003) ซึ่งประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) yeast extract 10, peptone 10, beef extract 5, $(NH_4)_2SO_4$ 5 และพีเอชเท่ากับ 7 ในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์จะมีการถ่ายเชื้อใหม่ (subculture) ทุกเดือน

3. สารเคมี

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ : $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4, $C_3H_5NaO_2$, $C_4H_8O_2$

- สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ : HCl, NaOH, H_2SO_4, $CHCl_3$, NaOCl, C_2H_6O, CH_3COCH_3

อุปกรณ์

- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น G25 ยี่ห้อ New Brunswick Scientific
- เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น 32 R ยี่ห้อ Universal
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น 200 rt ยี่ห้อ Zenyth
- ตู้ถ่ายเชื้อ รุ่น V8 ยี่ห้อ Clean
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ รุ่น HV-85 ยี่ห้อ Hirayama
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 29 ยี่ห้อ Memmert
- ถังหมัก รุ่น MDC-300 ยี่ห้อ EYELA
- เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง รุ่น 320 ยี่ห้อ Mettler Toledo
- ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น VD ยี่ห้อ WTB binder
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทรานสมิชชั่น รุ่น JEM-100CX II ยี่ห้อ JEOL

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อเริ่มต้น เพื่อใช้ในการเตรียมหัวเชื้อ

นำเชื้อ *Ralstonia eutropha* TISTR 1095 ที่เก็บรักษาในอาหาร (Nutrient agar slant) มาถ่ายลงในอาหารเหลว (Nutrient broth) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 200 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการแบบปลอดเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น จากนั้นนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ โดยรักษาอุณหภูมิไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์แห้ง เลือกช่วงเวลาและปริมาณจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นตลอดการวิจัย

2. การเตรียมกรดคาร์บอกซิลิกโดยการหมักเส้นใยปาล์มเพื่อใช้ในการทดลอง

นำเส้นใยปาล์มที่ผ่านการแปรสภาพ (pretreatment) ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 0.1 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเส้นใยปาล์มผสมกับตะกอนสลัดจ์จากบ่อบำบัดน้ำเสียที่ผ่านการทำให้แห้งในอัตราส่วน 80:20 เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน มาหมักโดยใช้จุลินทรีย์ผสมจากตะกอนดินก้นบ่อบำบัดน้ำเสียโรงงานน้ำมันปาล์ม 3.5 ลิตร และเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 140 กรัม เพื่อเป็นบัฟเฟอร์ควบคุมพีเอชให้อยู่ประมาณ 6.0-6.5, เติมของเหลว deoxygenate water 14 ลิตร เพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และเติมสารละลายไอโอโดฟอร์ม 14 มิลลิลิตร เป็นสารยับยั้งการสร้างมีเทน ทำการหมักในถังปฏิกรณ์แบบไร้อากาศขนาด 20 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วัน ทำการวิเคราะห์พีเอช ชนิดและปริมาณกรดที่สร้างขึ้น ปริมาณฟอสเฟตและปริมาณไนโตรเจน

3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA แบบกะ

3.1 การวางแผนการทดลองแบบการศึกษาทีละปัจจัย

3.1.1 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

นำน้ำหมักที่ได้จากการหมักเส้นใยปาล์ม (จากข้อ 2) ศึกษาการเติม propionate และ butyrate ในปริมาณ 0, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร นำไปเพาะเลี้ยง *R. eutropha* TISTR 1095 โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ที่สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7 เพาะเลี้ยงในตู้เขย่าที่ความเร็วเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ และปริมาณ PHA ที่เซลล์ผลิตได้ เลือกความเข้มข้นของกรดที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ให้ปริมาณ PHA สูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.1.2 ศึกษาอัตราส่วนระหว่าคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N)

เลือกความเข้มข้นและชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณ PHA สูงสุด จากข้อ 3.1.1 มาใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยใช้สภาวะในการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 เพื่อศึกษาอัตราส่วน C:N ที่เหมาะสมโดยทำการเติมแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH)_2SO_4$ ที่อัตราส่วน

C:N ratio เท่ากับ 30, 50 และ 70 เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติม (C:N=97) ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 เลือกชุดการทดลองที่ให้ปริมาณ PHA สูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.1.3 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งฟอสเฟต

เลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA จากข้อ 3.1.2 มาใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยใช้สภาวะในการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 เพื่อศึกษาหาความเข้มข้นของฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA โดยเลือกใช้โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ที่ความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 7.5 และ 10 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.1.2 เลือกชุดการทดลองที่ให้ปริมาณ PHA สูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 การวางแผนการทดลองแบบการศึกษาผลร่วมของปัจจัยต่างๆ ต่อการเจริญและผลิต PHA ของเชื้อ *Ralstonia eutropha* TISTR 1095

3.2.1 การออกแบบการทดลอง

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมโพรพิโอเนต กรดบิวทิริก แอมโมเนียมซัลเฟต และไดโพแทสซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตแตกต่างกันเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย โดยการวางแผนแบบ Partial Factorial Design และกำหนดจุดทดลองแบบ Central Composit Design โดยปัจจัยที่ทำการศึกษาประกอบด้วย 4 ปัจจัย ปัจจัยละ 5 ระดับ โดยทำการกำหนดรหัสของตัวแปรอิสระและรหัสของระดับของตัวแปรดังแสดงในตารางที่ 4 จากจำนวนปัจจัยและระดับที่ทำการศึกษานำไปกำหนดชุดการทดลอง และวัดการตอบสนองโดยวัดการเจริญเติบโตและปริมาณการสะสม PHAของจุลินทรีย์

3.2.2 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลทางสถิติของข้อมูลใช้สมการพอลิเมียลอันดับสองเพื่อความเหมาะสมของข้อมูลที่ได้จากการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งสามารถเสนอแบบจำลองของการตอบสนองต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Y_1) การผลิต PHA (Y_2) และการสะสม PHA ภายในเซลล์ (Y_3) แสดงดังสมการ

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_4 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{44} x_4^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3$$
$$+ \beta_{14} x_1 x_4 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{24} x_2 x_4 + \beta_{34} x_3 x_4 \qquad (1)$$

เมื่อ Y_i (i = 1-3) คือผลการตอบสนองที่ทำนายด้วยสมการ X_1, X_2, X_3 และ X_4 คือตัวแปรที่ใช้ในการทดลอง β_0 คือ ค่าคงที่ของสมการ β_1, β_2, β_3, และβ_4 คือผลของปัจจัยเดียว β_{11}, β_{22}, β_{33}, และβ_{44}คือ

ผลของปัจจัยที่เพิ่มความเข้มข้นเป็นสองเท่า β_{12}, β_{13}, β_{14}, β_{23}, β_{24}, และβ_{34} คือผลร่วมของระหว่างสองปัจจัย การวิเคราะห์ค่าทางสถิติจะแสดงโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วม (ANOVA) การหาสภาวะที่เหมาะสมของสมการคณิตศาสตร์ที่ไม่ใช่สมการเชิงเส้นจะใช้โปรแกรม Design Expert (version 5.0.8) (Stat-Ease Corporation, USA) สำหรับศึกษาความเหมาะสมของสมการหลายตัวแปรเพื่อใช้ในการคำนวนผลหาผลได้ของเซลล์ ปริมาณ PHA และการสะสม PHA ซึ่งการตอบสนองจะได้จากการเปรียบเทียบด้วยสมการทำนาย และสมการพอลิโนเมียลที่เหมาะสมจะแสดงให้เห็นโดยใช้จุดที่ต่ำที่สุดของพื้นผิวด้วยเหตุนี้จะทำให้เราเห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองและระดับการทดลองของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง (Lakshman *et al.*, 2004)

ตารางที่ 4 ตัวแปรและระดับของตัวแปรสำหรับการออกแบบการทดลอง

Table 4 Variable and their levels for CCRD

Variable name	Symbol		Levels*				
	Coded	Uncoded	-2	-1	0	1	2
Propionate(g l^{-1})	X_1	x_1	0	2.5	5	7.5	10
Butyrate(g l^{-1})	X_2	x_2	0	2.5	5	7.5	10
$(NH_4)_2SO_4$(g l^{-1})	X_3	x_3	0	0.5	1	1.5	2
KH_2PO_4(g l^{-1})	X_4	x_4	0	0.025	0.05	0.075	0.1

- $X_1, X_2 = (x_1 - 5)/2.5; X_3 = (x_2 - 1)/0.5; X_4 = (x_3 - 0.05)/0.025$

3.2.3 การทดสอบผลร่วมระหว่าง Propionate, Butyric acid, Ammonium sulphate และ Potassium dihydrogenphosphate ต่อการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์

นำน้ำหมักที่ผ่านการหมุนเหวี่ยงเอาส่วนตะกอนออกก่อน แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง whatman number 40 แบ่งใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 100 มิลลิลิตรแล้วเติมสารอาหารทั้ง 4 ชนิด ตามความเข้มข้นของแต่ละชุดการทดลอง แสดงดังตารางที่ 5 หลังจากนั้นทำการปรับพีเอชเท่ากับ 7 และนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วนำมาเติมหัวเชื้อเริ่มต้นฟลาสก์ละ 10 มิลลิลิตร เลี้ยงในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ทำการสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHA นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ

4. การศึกษาการผลิต PHA ในถังปฏิกรณ์แบบกะ

4.1. ศึกษาอัตราการให้อากาศ

เลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA จากข้อ 3.2 มาใช้ในการศึกษาหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA โดยทำการทดลองในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 มีอัตราการให้อากาศ 0.5, 1 และ 2 vvm ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ และปริมาณ PHA ที่เซลล์ผลิตได้ เลือกชุดการทดลองที่ให้ปริมาณ PHA สูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.2 ศึกษาอัตราการกวน

เลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA จากข้อ 4.1 มาใช้ในการศึกษาหาอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA โดยมีอัตราการกวนที่ความเร็ว 100, 200 และ 300 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ และปริมาณ PHA ที่เซลล์ผลิตได้ เลือกชุดการทดลองที่ให้ปริมาณ PHA สูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.3 ศึกษาการควบคุมพีเอช

เลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA จากข้อ 4.2 มาใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบการควบคุมพีเอช และไม่มีการควบคุมพีเอช โดยจะทำการควบคุม pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 ทั้งสองชุดการทดลอง ซึ่งในส่วนของชุดการทดลองที่มีการควบคุม pH จะทำการควบคุม pH ตลอดการทดลองโดยใช้ตัวควบคุมอัตโนมัติด้วยชุด controller โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ เพื่อควบคุมพีเอช ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ และปริมาณ PHA ที่เซลล์ผลิตได้

5. ศึกษาการผลิต PHA ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ

ศึกษาการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ แบบสองช่วง โดยเลือกสภาวะเหมาะสมต่างๆ ที่ได้ทำการศึกษาในข้อ 4 มาใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. eutropha* TISTR 1095 เพื่อเปรียบเทียบผลการเพาะเลี้ยงแบบกะต่อการผลิต PHA ซึ่งการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ แบบสองช่วง จะทำการศึกษาในถังหมักขนาด 3 ลิตร ใช้ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 1 ลิตร และเริ่มจากทำการเลี้ยงเชื้อแบบกะเป็นเวลา 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเติมสารอาหารเพิ่มอีก 1 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ และปริมาณ PHA ที่เซลล์ผลิตได้ เพื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิต ผลผลิต PHA จากการเพาะเลี้ยงแบบกะ

6. ศึกษาจลนพลศาสตร์ของการผลิต PHA

นำข้อมูลที่ได้จากระบบการเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบกึ่งกะในข้อ 5 มาคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ของจลนพลศาสตร์ ดังนี้ อัตราการเจริญจำเพาะ (μ), สัมประสิทธิ์ผลผลิตของการเจริญของเซลล์ ($Y_{x/s}$), สัมประสิทธิ์ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ใช่เซลล์ ($Y_{p/s}$) และอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ (productivity) โดยใช้สมการดังนี้

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t \quad (2)$$

$$Y_{x/s} = (X - X_0)/(S_0 - S) \quad (3)$$

$$Y_{p/s} = P/(S_0 - S) \quad (4)$$

$$\text{Productivity} = P/t \quad (5)$$

โดยในการหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะจะใช้การพลอตกราฟระหว่าง ln x กับ t จะได้ค่า slope ซึ่งจะมีค่าเท่ากับอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) โดยที่ X คือปริมาณเซลล์ที่เวลาที่สนใจ X_0 คือปริมาณเซลล์เริ่มต้น และ S คือปริมาณสารอาหารที่เวลาที่สนใจ S_0 คือปริมาณสารอาหารเริ่มต้น

7. ศึกษาชนิดและปริมาณของสารพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

เลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเติมเชื้อเริ่มต้น สารอาหาร รวมถึงควบคุมอุณหภูมิและค่าพีเอชเริ่มต้นให้เหมาะสม ร่วมกับการใช้อัตราการให้อากาศ และการกวนที่เหมาะสมจากข้อ 5 การศึกษาหาสัดส่วนองค์ประกอบมอนอเมอร์ของพอลิเมอร์นั้นจะใช้พอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ โดยนำเอาเซลล์ *R. eutropha* TISTR 1095 มาสกัดสาร PHA โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เก็บส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วจึงทำการล้างด้วยอะซีโตน และล้างด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ร้อยละ 99.8 เก็บส่วนของตะกอนที่ได้มาละลายด้วยสารละลายคลอโรฟอร์มแล้วให้ความร้อนเพื่อให้ PHA ละลายอย่างสมบูรณ์ ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนทำการกรองเก็บส่วนใสไว้ จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาตกตะกอนด้วยเฮกเซน ทำการแยกตะกอนของ PHA ที่ได้ด้วยกรวยแยก จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์คุณลักษณะบางประการของพอลิเมอร์ด้วยวิธีการดังนี้

7.1 การวิเคราะห์หน่วยย่อยของพอลิเมอร์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrophotometer (GC-MS)

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบย่อยของ PHA สามารถวิเคราะห์ได้โดยการเตรียมเมทิลเอสเทอร์ของพอลิเมอร์ ด้วยการนำพอลิเมอร์ 4-10 มิลลิกรัมละลายในคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมกรดซัลฟิวริก-เมทานอล (15:85) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต้มในอ่างน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 140 นาที เพื่อทำการเปลี่ยนกรดไขมันให้กลายเป็นเมทิลเอสเทอร์ แล้วทำการ

วิเคราะห์ด้วยการใช้ gas chromatography-mass spectrophotometer (GC-MS) ตามวิธีการของ Ganzeveld และคณะ (1999) ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการทดสอบแยกเป็น 2 ส่วนคือ สภาวะของ Gas Chromatograph จะควบคุมโดยใช้ Inlet temperature 250 ^{o}C, Splitless mode 0.07 minute, Oven initial temperature: 90 ^{o}C 5 minutes, Ramp to 160 ^{o}C 3 minutes at 4 ^{o}C/minute, Ramp to 230 ^{o}C 10 minutes at 10 ^{o}C/minute และใช้คอลัมน์ชนิด INNOWAX, 30 m., film thickss 0.25 um, ID. 0.25 mm และสภาวะของ Mass Spectrometer ควบคุมโดยใช้ Ionization mode: Electron Ionization, Acquisition mode: Scan 55-500 amu, Solvent delay time: 4.0 minutes, Transfer line temperature: 230 ^{o}C

7.2 การวิเคราะห์หาอุณหภูมิหลอมเหลวตัวผลึก (T_m) และอุณหภูมิการแข็งตัวของผลึก (T_c) ด้วยวิธี Differential scanning calorimetry (DSC)

การหาจุดหลอมเหลวสามารถทำได้โดยนำเอาพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัด 10 มิลลิกรัม ใส่ลงในภาชนะอลูมิเนียม (aluminium plachet) แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Perkin-Elmer DSC7 differential scanning calorimetry โดยทำการวิเคราะห์จะเริ่มที่ -100 องศาเซลเซียส ถึง 250 องศาเซลเซียส และให้อัตราการเพิ่มของอุณหภูมิเท่ากับ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจนที่ 20 มิลลิลิตรต่อนาที (Slater *et al*., 1992)

7.3 การวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชั่นด้วย Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

การวิเคราะห์ด้วย FTIR เริ่มด้วยการนำตัวอย่างพอลิเมอร์ละลายด้วยคลอโรฟอร์มจากนั้นถ่ายลงใน KBr pellets และหลังจากตัวทำละลายระเหยอย่างสมบูรณ์ ทำการบันทึก FTIR สเปคตรัมที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรมิเตอร์ รุ่น EQUINOX 55 (Bruker) ทำการบันทึกค่าตั้งแต่ความยาวคลื่น 400- 4000 cm^{-1} กำหนดค่า solution เท่ากับ 2 cm^{-1}

7.4 การวิเคราะห์ Crystallinity ด้วยเครื่อง X - ray diffractometer

การวิเคราะห์ crystalline structure และ crystallity สามารถทำได้ด้วยการนำตัวอย่างพอลิเมอร์ที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง X - ray diffractometer (PHILIPS X'Pert MPD) โดยกำหนดช่วงของ 2θ ตั้งแต่ 0 ถึง 80 ด้วยการเพิ่มที่ละ 0.05^{0}

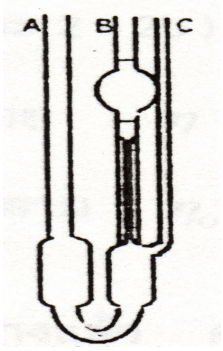
7.5 การวิเคราะห์เพื่อหาสัดส่วนองค์ประกอบมอนอเมอร์ของพอลิเมอร์

สามารถวิเคราะห์สัดส่วนและองค์ประกอบของมอนอเมอร์โดยวิเคราะห์ด้วย NMR analysis ซึ่งใช้ Bruker DPX-300 nuclear magnetic resonance spectrometer และทำการวิเคราะห์โดยใช้ H^{1} และ C^{13} ของตัวอย่างใน $CDCl_3$ และใช้ tetramethylsilane (TMS) เป็น internal standard และทำการวิเคราะห์ตามกระบวนการของ Yagi และคณะ (1996)

7.6 **การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล**

เตรียมสารละลายพอลิเมอร์โดยใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายด้วยความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น โดยให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.1 – 1.0 กรัมต่อเดซิลิตร และตัวทำละลายบริสุทธิ์ 1 ชุด

วัดค่าเวลาการไหล (flow-time, t) ของสารละลายแต่ละความเข้มข้นจากความเข้มข้นต่ำไปยังความเข้มข้นสูง โดยทำดังนี้ปิเปตสารละลายด้วยปริมาตรที่แน่นอนในช่วง 10-15 มิลลิลิตร ใส่ในวิสโคมิเตอร์ (viscometer) ชนิด Ubbelohde ที่สะอาดผ่านทางด้าน A และติดตั้งวิสโคมิเตอร์ในอ่างควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในแนวดิ่ง พักไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้เกิดการปรับสมดุลของอุณหภูมิ จากนั้นให้ลมดันผ่านทางด้าน A อย่างช้าๆ โดยใช้นิ้วปิดทางด้าน C ในขณะเดียวกัน เมื่อสารละลายถูกดันขึ้นไปตามท่อด้าน B เมื่อระดับของสารละลายอยู่เหนือขีดบนของด้าน B พอประมาณ หยุดให้ลมดันพร้อมเปิดทางด้าน C เริ่มจับเวลาในช่วงของการเคลื่อนที่จากขีดบนมาถึงขีดล่างของด้าน B ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง บันทึกค่าเฉลี่ยของเวลาการไหลในแต่ละค่าของความเข้มข้น ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 วิสโคมิเตอร์ชนิด Ubbelohde

Figure 7. Ubbelohde viscometer.

สำหรับตัวทำละลายบริสุทธิ์ ทำในทำนองเดียวกันกับสารละลาย และควรทำเป็นครั้งแรกก่อนที่จะเริ่มทำการทดลองกับสารละลาย

จากค่าเวลาการไหลเฉลี่ย คำนวณค่า η_{red} และ η_{inh} พร้อมทั้งสร้างกราฟระหว่าง η_{red} และ η_{inh} กับความเข้มข้น หาจุดตัดแกน η_{red} และ η_{inh} ค่า K' และ K'' และ M_v โดยใช้โปรแกรม Via M_v version 1.0 ของภาควิชาวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ คณะวิทยาศาสตร์ โดยใช้สมการของ Sakurada ในการคำนวณหาค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยดังแสดงในสมการที่ 4

$[\eta] = K\overline{M}_V^{\ a}$ ซึ่งสามารถแปลงสมการได้เป็น $M_V = \sqrt[a]{[n/K]}$ (6)

เมื่อ K คือ ค่าคงที่ ที่มีความสัมพันธ์ของแรงกระทำระหว่างตัวถูกละลายกับตัวทำละลายในสารละลายที่อุณหภูมิหนึ่ง และ a เป็นค่าคงที่ ที่มีความสัมพันธ์ถึงความสามารถในการละลายของตัวถูกละลายในตัวทำละลาย และการจัดรูปร่างของโมเลกุลตัวถูกละลายในสารละลายที่อุณหภูมิหนึ่งๆ ส่วนค่า M เป็นค่ามวลโมเลกุลของตัวถูกละลาย สำหรับสารพอลิเมอร์ และใช้ค่าความหนืด [η] คำนวณค่ามวลโมเลกุล

วิธีการวิเคราะห์

1. การหาปริมาณกรดในกรดอินทรีย์ผสม

- การวิเคราะห์ปริมาณกรดโดยใช้ gas chromatography

เก็บตัวอย่างของเหลว นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 รอบ/วินาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำตัวอย่างที่ปั่นเหวี่ยงแล้ว 1 มิลลิลิตร นำมาเติม 3-M phosphoric acid 1 มิลลิลิตร และ 4-Methyl-n-valeric acid 1 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ที่ 15000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 1 นาที และนำส่วนใสมาฉีดเข้า gas chromatography ซึ่งใช้ capillary column (J&W Science, model DB-FFAP) โดยกำหนดสภาวะของ gas chromatography มีดังนี้มีความดันอากาศภายในเครื่อง 50 psi, ความดันของก๊าซ helium 60 psi และ ความดันของไฮโดรเจน 40 psi ตั้งค่าของ Oven temperature = 50°C, Inlet temperature= 230°C, Detection temperature = 250 °C, Ramp = 20 $^{\circ}$C/min, H_2 flow = 40 มิลลิลิตร/min, Air flow=400มิลลิลิตร/min, He flow=179 มิลลิลิตร/min และใช้สารละลายกรดระเหยผสมเพื่อเป็นสารมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบการสร้างกรด สารละลายกรดผสมประกอบด้วย กรดฟอร์มิก, กรดอะซิติก, กรดโพรพิโอนิก, กรดไอโซบิวทิริก, กรดไอโซวาเลริก, กรดไอโซคาโพรอิก และกรดเฮปทาโนอิก

2. การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Kjeldahl method)

นำตัวอย่างน้ำหมักจากการหมักเส้นใยปาล์มที่ปั่นเหวี่ยงแล้ว 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดย่อย ใส่ catalyst K_2SO_4 ลงในหลอดๆ ละ 1 เม็ด เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร แล้ววางลงในเครื่องย่อยที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส ย่อยเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนสารละลายในหลอดใสและไม่มีควัน นำหลอดออกจากจานเครื่องย่อยวางในที่วางหลอด และทิ้งไว้ให้สารละลายอุ่นเติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 75 มิลลิลิตร จัดอุปกรณ์กลั่น เปิดสวิตซ์ไฟและเปิดน้ำหล่อเย็นเครื่องควบแน่น เติม 4% boric acid ลงในขวดรูปชมพู่ ประมาณ 40 มิลลิลิตร จากนั้นวางลงในเครื่องกลั่นซึ่งพร้อมที่จะกลั่น โดยให้ส่วนปลายของเครื่องกลั่น เติม 40% NaOH ประมาณ 20 มิลลิลิตร ทำการกลั่นจนสารละลายในขวดรูปชมพู่เปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเขียว ได้สารละลายที่กลั่นปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำสารละลายในขวดรูปชมพู่ที่ได้มาไตเตรตกับกรด 0.1 N HCl จนได้จุดยุดติเป็นสีชมพู บันทึก

ปริมาตรกรดที่ใช้ ทำ blank ด้วยวิธีเดียวกันแต่ไม่ใส่สารละลายตัวอย่าง นำค่าที่ได้ไปคำนวณปริมาณไนโตรเจน (AOAC., 1999)

3. การหาปริมาณฟอสเฟต (Ascorbic Acid Method)

นำตัวอย่างน้ำหมักจากการหมักเส้นใยปาล์มที่ปั่นเหวี่ยงแล้ว 50 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมฟีนอล์ฟทาลีน 1 หยด ถ้าเกิดสีแดงให้หยด 5 N H_2SO_4 ลงไปจนกระทั่งสีแดงหายไปจึงเติมน้ำยารวม (combined reagent) 8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 – 30 นาที เพื่อให้เกิดสีก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 880 นาโนเมตรนำค่าที่ได้ไปอ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน (APHA, AWWA and WPCF, 1998)

4. การหาปริมาณคาร์บอนอินทรีย์ทั้งหมด (TOC)

นำตัวอย่างน้ำหมักจากการหมักเส้นใยปาล์มมาปั่นเหวี่ยง นำส่วนใสที่ได้มากรองด้วยแผ่นกรอง 0.2 ไมโครเมตร บรรจุในขวดเก็บตัวอย่างนำไปวิเคราะห์หาปริมาณคาร์บอนอินทรีย์ทั้งหมดโดยการวิเคราะห์ค่า COD (APHA, AWWA and WEF, 1998) โดยนำค่าที่ได้มาคำนวณตามสมการด้านล่างนี้

$$\text{TOC (mg/l)} = \frac{(\text{ค่าของ COD} - \text{ค่าของ Blank}) \times \text{dilution}}{3.22} \qquad (7)$$

5. การวัดการเจริญของเชื้อ

- การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry Cell Weight, DCW)

ปิเปตตัวอย่าง ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (ด้วยการนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสออกแล้วนำตะกอนเซลล์อบให้แห้งที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่ ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ และชั่งน้ำหนัก ทำการทดลองซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง

6. การวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

- การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative determination)

การวิเคราะห์หาปริมาณ PHA เชิงปริมาณสามารถทำได้โดยการนำเซลล์ที่ผ่านการอบแห้งแล้วเติมสารละลาย Sodium dodecyl sulfate (SDS) เข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ทำการปรับพีเอชเป็น 10 ผสมกันและบ่มบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 60 นาที ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงใช้ความเร็ว 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 นาที และล้างด้วย Sodium hypochlorite เข้มข้น

ร้อยละ 5.64 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และล้างด้วย deionize water ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง โดยตะกอนสุดท้ายนำไปบ่มแห้งบน aluminum dish ที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้น้ำหนักคงที่ ซึ่งการคำนวณปริมาณของ PHA จะพิจารณาในรูป PHA coefficient เทียบกับปริมาณเซลล์ ($Y_{p/x}$) เป็นการคำนวณพิจารณา PHA ต่อหนึ่งหน่วยน้ำหนักแห้ง (สำหรับการวิเคราะห์ทำ 2 ซ้ำ)

- การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Qualitative determination)

นำเซลล์แห้งจำนวน 40 มิลลิกรัม ผสมกับสารละลายไดคลอโรเอทีรีน 2 มิลลิลิตรและสารละลายโพรพานอล-กรดไฮโดรคลอริก 2 มิลลิลิตร และสารละลาย internal standard 0.2 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดให้สนิทแล้วจึงนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำมาวางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องหลังจากนั้นเติมน้ำ 4 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากันแล้วจึงนำส่วนใสมาฉีดเข้า gas chromatography ซึ่งใช้ fused silica capillary column (0.22 mm x 30 m, SGE, Australia) โดยกำหนดสภาวะของ gas chromatography มีดังนี้ อุณหภูมิในการฉีด (injection) 220 °C, อุณหภูมิ detector 250 °C อุณหภูมิ column 130 °C คงที่เป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงเพิ่มขึ้นเป็น 185 °C โดยมีอัตราการเพิ่มเท่ากับ 10 °C/min และคงที่อุณหภูมิ 185 °C เป็นเวลา 1 นาที และใช้สาร PHA จาก Aldrich (USA) เป็นสารมาตรฐานที่ใช้เพื่อเปรียบเทียบ