บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

จุลินทรีย์

- แบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็ม ES 16 ที่แยกได้จากชายฝั่งตะวันออก (พัทยา) โดยอมรรัตน์ ตั้งประสิทธิภาพ (2543)
- แบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มสายพันธุ์กลายของ strain ES 16 สองสายพันธุ์คือ N20 และ U7 ซึ่งผ่านการกลายพันธุ์โดยใช้สาร NTG และ UV ตามลำดับ (วาริท หมัดหมาน 2545)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มที่ใช้ในการทดลองนี้เก็บรักษาที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ โดยการ stab ในอาหารกลูตาเมท-มาเลต (GM) ที่มีเกลือ (NaCl) 3% เลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อทุก 2 เดือน

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ

- Glutamate malate (GM) medium ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) : L-glutamic acid 3.8, D,L-malate 2.7, yeast extract 2.0, KH_2PO_4 0.5, K_2HPO_4 0.5, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2, $CaCl_2.2H_2O$ 0.053, $MnSO_4.5H_2O$ 0.0012, NaCl 30, วิตามิน (มิลลิกรัมต่อลิตร) : nicotinic acid 1.0, thiamine 1.0, biotin 0.01 รวมถึงปรับพีเอชเป็น 7.0 (Lascelles, 1956)
- Glutamate acetate (GA) medium มีองค์ประกอบอาหารเช่นเดียวกับ GM medium แต่ใช้โซเดียมอะซิเตท 5.44 กรัมต่อลิตร แทน D,L-malate 2.7 กรัมต่อลิตร (กรัมต่อลิตร) ประกอบด้วย: L-glutamic acid 3.8, $C_2H_3O_2Na$ 5.44, yeast extract 2.0, KH_2PO_4 0.5, K_2HPO_4 0.5, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2, $CaCl_2.2H_2O$ 0.053, $MnSO_4.5H_2O$ 0.0012, วิตามิน (มิลลิกรัมต่อลิตร) : nicotinic acid 1.0, thiamine 1.0, biotin 0.01 และ NaCl 30 ปรับพีเอชเป็น 7.0 (Sangkharak *et al.,* 2005)

อุปกรณ์

1) อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

- หลอดไฟฟ้าทังสเตน 100 วัตต์
- โถแก้วไร้อากาศ Model Gas Pak 150

- ฟลาสก์ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
- ถังหมักขนาด 5 ลิตร (ยี่ห้อ EYELA รุ่น MDL-300)
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (ยี่ห้อ New Brunswick รุ่น Model G25-KLG)

2) อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

- เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (ยี่ห้อ Anthos รุ่น Model Zenyth200rt)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (ยี่ห้อ Hettich รุ่น Model UNIVERSAL.32)
- เครื่องวัดพีเอช (ยี่ห้อ Mettler)
- เครื่องเขย่าหลอด (Vortex mixer)
- เครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrophotometer (GC-MS)
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) ของบริษัท JEOL รุ่น JSM-35 CF
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทรานสมิชชั่น (Transmission electron microscope) ของบริษัท JEOL รุ่น JEM-100 CX II
- ตู้บ่ม (บริษัท Memmert)

วิธีการวิเคราะห์

1) การเจริญของเชื้อ

วัดการเจริญของเชื้อโดยการวัดความขุ่นหรือการดูดกลืนแสง เริ่มจากการเหวี่ยงแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นทำการล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง วัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ 660 นาโนเมตร (OD_{660}) (Shimisu *et al*., 1990)

2) ปริมาณเซลล์

วัดปริมาณเซลล์ของเชื้อโดยใช้วิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง เริ่มจากการเหวี่ยงแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นทำการล้างด้วยน้ำกลั่น นำเซลล์ใส่ในจานเพาะเชื้อที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส อบจนแห้งและน้ำหนักคงที่ (Jung *et al*., 2000)

3) ปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

3.1) การวิเคราะห์ปริมาณ PHB เชิงปริมาณ (Quantitative determination)

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ PHB ด้วยวิธี Gravimetric method โดยการเติม sodium dodecyl sulfate (SDS) 1% w/v ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ปรับพีเอชเป็น 10 ลงในเซลล์ที่ผ่านการ

วิเคราะห์น้ำหนักแห้ง และบ่มบนเครื่องเขย่า (orbital shaker) เป็นระยะเวลา 60 นาทีด้วยความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงใช้ความเร็ว 7,000 g เป็นเวลา 4 นาที แล้วล้างด้วย sodium hypochlorite 5.64% w/v ซึ่งใช้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเจือจางให้ได้ 5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 g เป็นเวลา 4 นาที และล้างด้วย deionized water ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง โดยนำตะกอนสุดท้ายไปบ่มแห้งบน aluminum dish ที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้น้ำหนักที่คงที่ (การวิเคราะห์ทำ 3 ซ้ำ) (Grothe and Chisti, 2000)

3.2) การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Qualitative determination)

การวิเคราะห์หา PHB เชิงคุณภาพสามารถวิเคราะห์ด้วยการเติมกรดซัลฟูริก 20 % ในเมทานอล-คลอโรฟอร์มลงในเซลล์จากการเก็บตัวอย่าง หรือเซลล์ที่ผ่านการทำแห้งระบบแช่เยือกแข็ง (lyophilized cell) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 140 นาที เพื่อเปลี่ยนกรดไขมันให้กลายเป็นเมธิลเอสเทอร์แล้ววิเคราะห์ด้วยการใช้ gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ตามวิธีการของ Ganzeveld (Ganzeveld *et al.*, 1999)

3.3) การสกัดและตกตะกอนพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

นำเซลล์ 5 กรัมละลายน้ำ 100 มิลลิลิตร ดึงตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้วที่มีฝาเกลียวปิดขนาด 10 มิลลิลตร ปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนของเซลล์ไว้แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ หรือ คลอรอกซ์ 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงที่ 30 องศาเซลเซียส เติมน้ำกลั่นลงไป 4 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วยอะซีโตน 5 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม นำส่วนของตะกอนมาล้างด้วยเอทธานอลบริสุทธิ์ 99.8% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม เก็บส่วนของตะกอนไว้ เติมคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 30 วินาที ทิ้งไว้ให้เย็นนำไปปั่นเก็บส่วนใสไว้ นำส่วนที่เป็นตะกอนข้างต้นไปสกัดพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตอีกครั้ง จากนั้นรวมส่วนใสที่ได้แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยมีหลอดที่มีขีดบอกปริมาตร 10 มิลลิลิตรรองรับ เติมคลอโรฟอร์มลงในหลอดแก้วจนปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร ซึ่งพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจะละลายอยู่ในคลอโรฟอร์ม จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาตกตะกอนด้วยเฮกเซน แล้วกรองจะได้ตะกอนพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่ 80 องศาเซลเซียส (คมกฤช ดลอารมย์, 2542)

วิธีการทดลอง

2.1 การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็ม

การเทียบเคียงหรือการจัดจำแนกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงนั้นสามารถทำได้โดยอาศัยหลักการเทียบเคียงทางสรีรวิทยา สัณฐานวิทยา รวมถึงความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน กับการเทียบเคียงด้วยเทคนิค 16s rDNA

2.1.1 การเทียบเคียงโดยใช้เทคนิคมาตรฐาน (Classical identification)

2.1.1.1 การเทียบเคียงเชื้อในระดับวงศ์ (family classification)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงอายุ 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวสูตร Sulfide medium และ Thiosulfate medium (Watanabe *et al.,* 1981) บ่มภายใต้สภาวะไร้อากาศ-มีแสง ถ้าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงไม่เจริญในอาหารดังกล่าว สามารถจัดเทียบเคียงเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่ม purple nonsulfur bacteria หรือ วงศ์ *Rhodospirillaceae* (Staley *et al.*, 1989)

2.1.1.2 การเทียบเคียงเชื้อในระดับสกุลและชนิด (Genus and species classification)

การจัดจำแนกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในระดับสกุลและชนิด สามารถทำได้ตามวิธีการที่ระบุใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Staley *et al.,* 1989) โดยเลี้ยงเชื้อในสภาวะไร้อากาศ-มีแสง โดยพิจารณาลักษณะดังนี้

ความต้องการอาหาร (Nutritional requirement)

ทดสอบในอาหาร Succinate medium เพื่อพิจารณาลักษณะการดำรงชีวิตซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น Photolithotroph (Photoautotroph), Photohetertroph, Chemolithotroph และ Chemoheterotroph

คุณลักษณะด้านสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic)

ศึกษารูปร่างเซลล์ การติดสีแกรม การเจริญของเซลล์ในอาหารภายใต้สภาวะไร้อากาศ-มีแสง และการสร้างเมือก รวมถึงการศึกษาลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และแบบ Thin-section electron microscopy

ศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทดสอบในอาหารทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์ ด้วยการแทงเข็มเขี่ยเชื้อที่มีเซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงลงในอาหารทดสอบที่อยู่ในหลอดแก้วปลายเปิด นำมาส่องไฟเพื่อสังเกตการเจริญในอาหารทดสอบว่ามีการแพร่ของเซลล์นอกหลอดแก้วปลายเปิดหรือไม่ ถ้ามีแสดงว่ามีการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย

คุณลักษณะในกระบวนการเมตาบอลิซึมหรือคุณสมบัติทางชีวเคมี (Metabolic or biochemical characteristic)

ความต้องการของอาหาร โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารทดสอบที่มีการเติมสารอาหารต่างๆ ได้แก่ เบนโซอิก ซิเตรท มาเลท แล็กแตท กลูโคส กลีเซอรอล เอทานอล ฟลุกโตส อะซิเตท ซอร์บิทอล ไพรูเวท กลูตาเมท และวาเลอเรท เลี้ยงภายใต้สภาวะไร้อากาศ-มีแสง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

คุณลักษณะของรงควัตถุ (characteristic of pigmentation)

การวิเคราะห์ชนิดของรงควัตถุสำหรับการสังเคราะห์แสง โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงอายุ 24 ชั่วโมงแล้วสแกนค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่มีค่าความยาวคลื่นตั้งแต่ 350-1030 นาโนเมตร สำหรับค่าความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์ถึงคุณลักษณะของชนิดรงควัตถุสำหรับการสังเคราะห์แสงแสดงไว้ในภาคผนวก ข

2.1.2 การเทียบเคียงเชื้อโดยเทคนิค 16S rDNA

วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA โดยการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR โดยนำสายพันธุ์ที่ต้องการศึกษาไปเลี้ยงใน GM medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้มีการเจริญอยู่ในระยะกลางของ log phase จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงและนำเซลล์ที่ตกตะกอนไปสกัด DNA และใช้ไพรเมอร์ (primer) UFUL (5'-GCCTAACACATGCAAGTCGA-3') และ536R (5'-GTATTACCG CGGCTGCTGG-3') โดยใช้สภาวะในการเพิ่มจำนวนคือ denature ที่ 94 องศาเซลเซียส 60 วินาที, annealing ที่ 48 องศาเซลเซียส 60 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 120 วินาที จำนวน 30 รอบ และ final extension 1 รอบ ที่ 48 องศาเซลเซียส 60 วินาที และที่ 72 องศาเซลเซียส 300 วินาที นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนไปหาลำดับโดยใช้ cycle sequencing ready reaction kit (Perkin-Elmer) และ electrophoresis DNA sequencing นำข้อมูลลำดับ 16S rDNA มาเปรียบเทียบกับลำดับของจุลินทรีย์ใน Gene Bank (htpp://www.ncbi.nlm.nih.gov)

2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์กลายที่มีคุณสมบัติในการผลิตโคพอลิเมอร์

สำหรับการเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มจำเป็นต้องเทียบเคียง ทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิม ES 16 และสายพันธุ์กลาย N20 และ U7 จากการทำการกลายพันธุ์โดยวาริท หมัดหมาน (2545) เพื่อเป็นการยืนยันผลของการเทียบเคียงว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์หลังจากการกลายพันธุ์ และเปรียบเทียบการผลิต PHB จากสายพันธุ์กลายทั้ง 2 สายพันธุ์กับสายพันธุ์ดั้งเดิมแต่จะศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์จากสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้

การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์กลาย N20 และ U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ glutamate-acetate (GA) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ในสภาวะที่มีอากาศ-ไร้แสง โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง วัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยเจือจางเชื้อด้วยอาหารเหลวสูตร GA เพื่อให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 แล้วใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

2.2.1 การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการผลิตพอลิเมอร์ภายในเซลล์

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ glutamate-acetate (GA) (กนกพร สังขรักษ์, 2547) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ในสภาวะที่มีอากาศ-ไร้แสง โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นย้อมเซลล์ด้วยสี Sudan black (วิธีการดังภาคผนวก ข) และถ่ายภาพเซลล์แบบ Thin-section electron microscopy

การคัดเลือกเชื้อ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์กลาย N20 และ U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ glutamate-acetate (GA) โดยใช้ปริมาตรเชื้อเริ่มต้น 10 % ภายใต้สภาวะให้อากาศ-ไร้แสง โดยการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 37^{0}C เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาค่า PHB

2.2.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร่วม

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ glutamate-acetate (GA) (กนกพร สังขรักษ์, 2547) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทดสอบผลการเติมแหล่งคาร์บอนร่วมคือ กรดวาเลอริกหรือกรดโพรพิโอนิก ความเข้มข้น 0, 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะให้อากาศ-ไร้แสง เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างปริมาตร 15 มิลลิลิตร ทุก 12 ชั่วโมง สำหรับใช้วิเคราะห์การเจริญของเชื้อ, ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลง และปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ รวมถึงวิเคราะห์การเกิดโคพอลิเมอร์ชนิด PHBV ด้วยการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ด้วยการใช้ gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) แล้วเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตโคพอลิเมอร์จากเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์กลายทั้งสองสายพันธุ์ เลือกสายพันธุ์ที่ให้ความสามารถในการผลิตดีพอลิเมอร์ดีกว่าพิจารณาจากค่า HV fraction สำหรับนำมาทดลองในการทดลองขั้นต่อไป

2.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB

2.3.1 ผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต

ใช้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้างต้นโดยทำการแปรผันความเข้มข้นของไนโตรเจนซึ่งอยู่ในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ glutamate-acetate (GA)

ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร และไม่เติม ภายใต้สภาวะให้อากาศ-ไร้แสง โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง วิเคราะห์ค่าต่างๆเช่นเดียวกับข้างต้น

2.3.2 ผลของยีสต์สกัด

ใช้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้างต้น เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ glutamate-acetate (GA) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีการเติมยีสต์สกัด 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะให้อากาศ-ไร้แสง เลี้ยงบนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง วิเคราะห์ค่าต่างๆเช่นเดียวกับข้างต้น แล้วเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตโคพอลิเมอร์จากเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์กลายข้างต้น เลือกความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่ส่งเสริมการผลิตโคพอลิเมอร์ที่ดีกว่าสำหรับนำมาทดลองในการทดลองขั้นต่อไป

2.3.3 ผลของพีเอชเริ่มต้น

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์กลายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมข้างต้น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการเลี้ยงภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5, 6, 7 และ 8 และทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 15 มิลลิลิตร ทุก 12 ชั่วโมง สำหรับใช้วิเคราะห์การเจริญ ค่าพีเอช และปริมาณ PHB ที่ผลิตได้

2.3.4 ผลของอุณหภูมิ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์กลาย ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสงเช่นเดียวกับข้อ 2.3.1 แต่เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 30 37 และ 45°C เก็บตัวอย่างปริมาตร 15 มิลลิลิตร ทุก 12 ชั่วโมง สำหรับใช้วิเคราะห์การเจริญ, ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลง และวิเคราะห์ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้

2.3.5 ผลของสภาวะการเลี้ยง

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์กลายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมข้างต้น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการเลี้ยงภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง สภาวะไร้อากาศ-มีแสง (3000 ลักซ์) และ สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3000 ลักซ์) โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิจากผลการทดลองในข้อ 2.3.4 ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อ 2.3.3 และทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 15 มิลลิลิตร ทุก 12 ชั่วโมง สำหรับวัดการเจริญ ค่าพีเอช และวิเคราะห์ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้

2.3.6 ผลของการให้อากาศ

เลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเติมเชื้อเริ่มต้น 10 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ glutamate-acetate (GA) ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นและควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม (จากผลข้างต้น) ใช้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ศึกษาผลของอัตราการให้อากาศในถังหมักในช่วง 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm เปรียบเทียบกับการเลี้ยงในสภาวะไร้อากาศ-ให้แสง 3000 ลักซ์

2.3.7 ผลของการกวน

เลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเติมเชื้อเริ่มต้น 10 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ glutamate-acetate (GA) ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นและควบคุมอุณหภูมิและอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม (จากผลข้างต้น) ศึกษาผลของการกวนโดยทำการปรับเปลี่ยนการกวนในถังหมักที่ 0, 100, 200 และ 300 รอบต่อนาที

2.4 การคัดเลือกตัวทำละลายสำหรับสกัดพอลิเมอร์ภายในเซลล์

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการศึกษาข้างต้น โดยใช้ปริมาตรเชื้อเริ่มต้น 10 % ภายใต้สภาวะให้อากาศ-ไร้แสง เลี้ยงบนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ศึกษาผลของตัวทำละลายสำหรับใช้วิเคราะห์ PHB คือ คลอโรฟอร์ม (Hahn *et al.,* 1994) ไดคลอโรมีเทน เมทานอล และเอทธิลีนคาร์บอเนต (Ganzeveld *et al.,* 1999) คัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดเพื่อใช้ในการสกัดโคพอลิเมอร์ปริมาณมากสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

2.5 ศึกษาคุณลักษณะของโคพอลิเมอร์

นำพอลิเมอร์ที่สกัดได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมมาวิเคราะห์คุณลักษณะบางประการของโคพอลิเมอร์ดังนี้

2.5.1 หน่วยย่อยของพอลิเมอร์

การวิเคราะห์หาหน่วยย่อยของพอลิเมอร์ทำได้โดยการเตรียมเมธิลเอสเทอร์ของพอลิเมอร์ด้วยการนำพอลิเมอร์ 4-10 มิลลิกรัมละลายในคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 มิลลิตร และเติมกรดซัลฟูริก-เมทานอล (15:85) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต้มในอ่างน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 140 นาที เพื่อทำการเปลี่ยนกรดไขมันให้กลายเป็นเมธิลเอสเทอร์แล้ววิเคราะห์ด้วยการใช้ gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) โดยใช้เครื่อง GC รุ่น HP 5890 GC ร่วมกับ mass selective detector รุ่น HP 5972 และใช้คอลัมน์ HP-5 ขนาด 30 มิลลิเมตร x 0.25 มิลลิเมตร x 25 มิลลิเมตร ซึ่งกำหนดอุณหภูมิของ injector และ detector เป็น 230°C และ 240°C ตามลำดับ โดยกำหนดโปรแกรมอุณหภูมิของ oven ไว้ที่ 100°C เป็นระยะเวลา 2 นาที จากนั้นปรับอุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 230°C ด้วยอัตรา 10°C/min (ดัดแปลงจาก Ganzeveld *et al.,* 1999)

2.5.2 อุณหภูมิหลอมเหลวของผลึก (T_m) และอุณหภูมิแข็งตัวของผลึก (T_c)

การหาจุดหลอมเหลวของพอลิเมอร์ สามารถทำได้โดยนำพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดปริมาณ 10 มิลลิกรัมใส่ลงในภาชนะอลูมิเนียม แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง Perkin-Elmer DSC7 differential scanning calorimetry โดยการวิเคราะห์จะเริ่มที่ -100 องศาเซลเซียส ถึง 250 องศาเซลเซียสและให้อัตราการเพิ่มอุณหภูมิเท่ากับ 10 องศาเซลเซียส/นาที และไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจนที่ 20 มิลลิลิตรต่อนาที (Slater *et al.*, 1992)

2.5.3 หมู่ฟังชั่นของพอลิเมอร์

การวิเคราะห์ด้วย FTIR เริ่มด้วยการนำตัวอย่างพอลิเมอร์ละลายในคลอโรฟอร์ม จากนั้นถ่ายลงใน KBr pellets และหลังจากตัวทำละลายระเหยอย่างสมบูรณ์ ทำการบันทึก Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) สเปคตรัมที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรมิเตอร์ (รุ่น EQUINOX 55 (Bruker)) ทำการบันทึกค่าตั้งแต่ความยาวคลื่น 400-4000 cm^{-1} กำหนดค่า resolution เท่ากับ 2 cm^{-1} (Doi, 1990)

2.5.4 หาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย และ polydispersity ของโคพอลิเมอร์

การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของพอลิเมอร์ทำได้ด้วยการวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการของความหนืด (Intrinsic viscosity; η) โดยมีความเกี่ยวข้องกับขนาดของโมเลกุลและลักษณะการจัดตัวของโมเลกุล ซึ่งวิเคราะห์ค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเป็น M_v ด้วยเครื่องวัดความหนืดแบบ capillary column ชนิด Ubbelohde viscometer ภายใต้การควบคุมอุณหภูมิที่ 30±0.1 องศาเซลเซียส โดยนำพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับพอลิเมอร์กลุ่ม PHA ใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย แล้วทำการกรองสารละลายพอลิเมอร์ด้วยตัวกรองชนิด filter glass ของบริษัท ROBU เพื่อกำจัดตะกอนปนเปื้อน ทำการวัดความหนืดของสารละลายข้างต้นที่ความเข้มข้นต่างๆแบบลำดับส่วน (เจือจางสารละลายความเข้มข้นเริ่มต้นด้วยคลอโรฟอร์มให้มีความเข้มข้นต่างๆ) และวิเคราะห์ความหนืดของสารละลายที่เป็นตัวทำละลาย (Blank) จากนั้นวิเคราะห์ค่า intrinsic viscosity ด้วยการปล่อยสารละลายพอลิเมอร์ผ่าน Ubbelohde viscometer จับเวลาที่สารละลายใช้ในการผ่านคอลัมน์ดังกล่าว แล้วคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (M_v) ตามสมการMark-Houwink: $\eta=K'(M_v)^a$ โดยกำหนดค่า K' เท่ากับ $1.18x10^{-4}$ เดซิลิตรต่อกรัม (dl/g) และ a เท่ากับ 0.78 (Luo and Netravali, 2003)

2.5.5 ค่าการเกิดผลึก (Crytallinity) ของพอลิเมอร์

วิเคราะห์โครงสร้างผลึก (crystalline structure) และความเป็นผลึก (crystallity) ของพอลิเมอร์ที่สกัดได้โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง X-ray diffractometer (PHILIPS X′Pert MPD) โดย

บรรจุใน copper tube และควบคุมค่าความต่างศักย์ รวมถึงกระแสไฟฟ้า เป็น40 kV และ 40mA ตามลำดับ รวมถึงกำหนดช่วงของ 2θ ตั้งแต่ 0 ถึง 80° ด้วยการเพิ่มทีละ 0.05°(Oliveira *et al.,* 2007)

2.5.6 ลักษณะผลึกกายภาพ

หลังจากสกัดพอลิเมอร์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์และล้างด้วยอะซีโตน และเอทธานอลบริสุทธิ์ 99.8% ปริมาตรอย่างละ 15 มิลลิลิตร ตามลำดับ เติมคลอโรฟอร์ม 10 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 30 วินาที ในหลอดฝาเกลียวปิดสนิท ทิ้งไว้ให้เย็นนำไปปั่นเก็บส่วนใสไว้ นำส่วนที่เป็นตะกอนข้างต้นไปสกัดพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตอีกครั้ง จากนั้นรวมส่วนใสที่ได้แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยมีหลอดที่มีขีดบอกปริมาตร 10 มิลลิลิตรรองรับ เติมคลอโรฟอร์มลงในหลอดแก้วจนปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร ซึ่งพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจะละลายอยู่ในคลอโรฟอร์ม จากนั้นตกตะกอนด้วยเฮกเซนแล้วกรองตะกอนพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต พิจารณาลักษณะตะกอนที่เกิดขึ้น รวมถึงขนาด และรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) (Doi, 1990)

2.5.7 สัดส่วนองค์ประกอบมอนอเมอร์ของพอลิเมอร์

วิเคราะห์สัดส่วนองค์ประกอบมอนอเมอร์ของพอลิเมอร์ด้วยเครื่อง NMR ซึ่งใช้ Bruker DPX-300 nuclear magnetic resonance spectrometer และวิเคราะห์โดย ^{13}C ใน $CDCl_3$ และใช้ tetramethylsilane (TMS) เป็น internal standard และวิเคราะห์ตามกระบวนการของ Yagi และคณะ (1996)