บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. เชื้อจุลินทรีย์

Alcaligenes latus TISTR 1403 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำโดยการได้รับสัมผัสรังสีแกมมาตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน (*A. latus* TISTR 1403/γ-2AA) ซึ่งเป็นส่วนที่ได้จากผลการศึกษาของขวัญใจ แก้วจันทร์ และคณะ (2554) โดยได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งจะใช้ชื่อเรียกว่า สายพันธุ์เดิม ตลอดการทดลอง

2. วัสดุและอุปกรณ์

2.1 เครื่องชั่ง METTLER รุ่น AE 200 และ OHAUS รุ่น Adventurer

2.2 กล้องจุลทรรศน์ Olympus รุ่น CH-2

2.3 เครื่อง Vortex Heidolph รุ่น REAX 2000 และรุ่น CERTOMAT

2.4 เครื่อง Hot plate รุ่น VELP scientific

2.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง HERMLE รุ่น z 323 k

2.6 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง SHIMADZU รุ่น UV-1601 UV-visible spectrophotometer

2.7 ตู้อบความร้อนสูง SHEL LAB รุ่น SL 1375 FX Sheldon manufacturing. Inc

2.8 หม้อนึ่งความดันไอ HIRAYAMA รุ่น HA-300 MII

2.9 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ SHEL LAB รุ่น Sheldon manufacturing Model 1265 และรุ่น YCW-04M

2.10 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ SHEL LAB รุ่น Sheldon manufacturing Inc. Model 1925

2.11 เครื่อง Sonicator Cole-Parmer รุ่น 8893

2.12 เครื่อง dispenser BioHT Rroline prosenser

2.13 ปิเปตดูดสารปริมาณน้อย รุ่น BiOHiT ขนาด 20-200 µL และ 100-1000 µL

2.14 เตาแผ่นความร้อนไฟฟ้า imarflex รุ่น IF-830

2.15 คิวเวตแก้ว Hellma ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

2.16 ขวดเก็บตัวอย่าง

2.17 หลอดปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge tube)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.18 ถังปฏิกรณ์ (Bioreactor) ปริมาตรบรรจุ 5 ลิตร รุ่น Biostat B บริษัท B. Braun Biotech International ประเทศเยอรมัน

2.19 คอลัมภ์ HP-5MS ความยาว 30 เมตร หนา 0.25 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร

2.20 หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร

2.21 ปิเปต (Pipette) ขนาด 10 มิลลิลิตร

2.22 บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 25 มิลลิลิตร และ 500 มิลลิลิตร

2.23 เครื่องเขย่า (Shaker) NB-101M

3. สารเคมี

3.1 2-อะมิโนแอนทราซีน (2AA) บริษัท Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstr

3.2 อะคริฟลาวิน (Acriflavin) บริษัท Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstr

3.3 5-โบรโมยูราซิล (5-Bromourasil) บริษัท Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstr

3.4 แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ บริษัท Ajax Laboratory Chemicals

3.5 แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.6 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.7 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.8 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.9 โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) บริษัท QRëC™

3.10 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) บริษัท QRëC™

3.11 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 12 ไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.12 แมกนีเซียมซัลเฟต 7 ไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท QRëC®

3.13 แคลเซียมไดคลอไรด์ ($CaCl_2$) บริษัท อินเตอร์เอ็ดดูเคชั่น ซัพพลายส์ จำกัด

3.14 แคลเซียมไดคลอไรด์ 2 ไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) บริษัท APS Finechem

3.15 กรดบอริก (H_3BO_3) บริษัท QRëC™

3.16 โคบอลต์คลอไรด์ 7 ไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 7H_2O$) บริษัท APS Finechem

3.17 ซิงค์ซัลเฟต 7 ไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.18 แมงกานีสคลอไรด์ 4 ไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) บริษัท Ajax Laboratory Chemicals

3.19 โซเดียมโมลิปดินัม 2 ไฮเดรต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) บริษัท Ajax Chemicals

3.20 นิลเกิลคลอไรด์ 6 ไฮเดรต ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.21 นิลเกิลซัลเฟต 7 ไฮเดรต ($NiSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.22 คอปเปอร์คลอไรด์ 2 ไฮเดรต ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$) บริษัท QRëC®

3.23 คอปเปอร์ซัลเฟต 5 ไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) บริษัท Ajax Chemicals

3.24 เฟอรัสคลอไรด์ไฮเดรต ($FeCl_2 \cdot H_2O$) บริษัท APS Finechem

3.25 เฟอรัสซัลเฟต 7 ไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)) บริษัท QRëC®

3.26 เฟอริกซิเตรท (Ferric citrate) บริษัท Fluka

3.27 โซเดียมซิเตรท (Sodium citrate) บริษัท FARMITALIA CARLO ERBA

3.28 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck KGaA, Darmstadt, Germany

3.29 โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรท ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.30 ไดไนโตรซาลิไซลิคแอซิด (DNS) บริษัท Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstr

3.31 โซเดียมโดดิซิลซัลเฟต (SDS) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.32 โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl)

3.33 น้ำตาลกลูโคส (Glucose) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.34 น้ำตาลฟรุคโตส (Fructose) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.35 น้ำตาลซูโครส (Sucrose) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.36 น้ำแช่ข้าวโพด (Corn Steep Liquor) บริษัท Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstr

3.37 กากน้ำตาล (Molasses)

4. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ DSMZ catalogue (1993)

4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ El-Sayed et al. (2009)

4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Savenkova et al. (1999)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมหัวเชื้อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์

เชื้อที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือ เชื้อ *A. latus* TISTR 1403 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำโดยการได้รับสัมผัสรังสีแกมมาตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน (*A. latus* TISTR 1403/γ-2AA) โดยใช้เป็นตัวควบคุม จะถูกเก็บรักษาบนอาหารวุ้นเอียงชนิด Nutrient agar (NA) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยจะเปลี่ยนถ่ายเชื้อใหม่ทุก ๆ 3 เดือน

สำหรับการนำมาใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น ทำโดยเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ที่ประกอบด้วยเปปโตน (Peptone) 5 กรัมต่อลิตร และเนื้อสกัด (Beef extract) 3 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในระยะปลายของการเจริญ (log phase) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นจำนวน 1 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็นความเข้มข้นร้อยละ 7 ในทุกการทดลอง

2. การเหนี่ยวนำแบคทีเรียด้วยสารเคมี และรังสีร่วมกับสารเคมี

นำเชื้อที่ต้องการใช้ทดลองมาเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นตามวิธีการในข้อ 1 นับจำนวนเซลล์ให้ได้จำนวน 1 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อทำให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และทำการเจือจางให้ได้จำนวน 1 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำเชื้อไปทำการเหนี่ยวนำตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

ครั้งที่ 1 นำเชื้อที่เตรียมไว้จำนวน 1 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาเหนี่ยวนำซ้ำโดยการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง ซึ่งใช้รังสีเหนือม่วงความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่มีระยะห่างจากเชื้อ 13 เซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านรังสีเหนือม่วงทุก ๆ 1 นาที นำไปเติมสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำไปกระจายเชื้อ (spread plate) โดยดึงตัวอย่าง 30 ไมโครลิตร ใส่ลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร NA นำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเลี้ยง พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างโคโลนีที่รอดชีวิต เพื่อนำไปตรวจสอบการเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยเลี้ยงในสูตรอาหารของ Grothe et al. (1999)

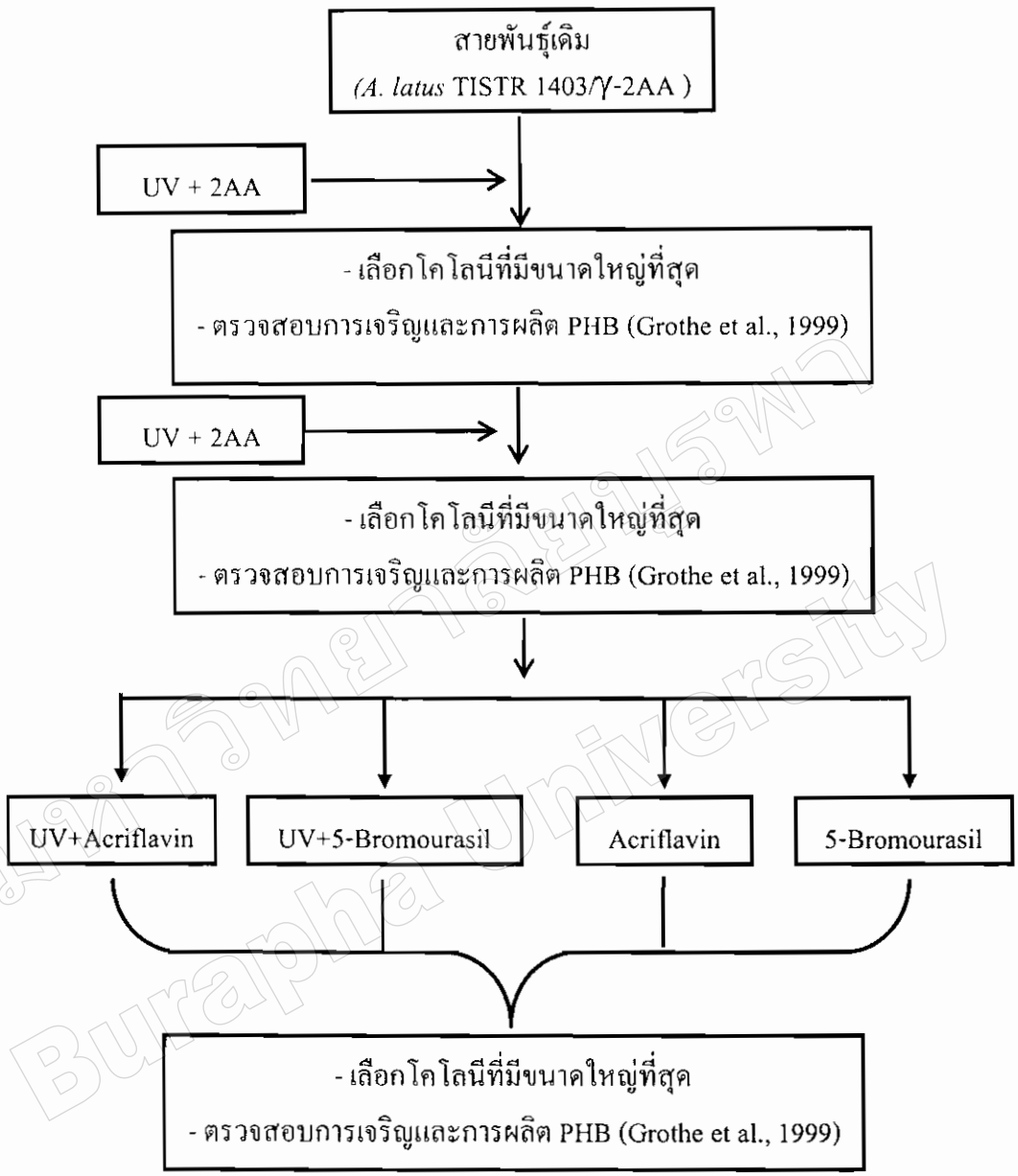
ครั้งที่ 2 นำเชื้อที่ได้จากการคัดเลือกครั้งที่ 1 มาเหนี่ยวนำซ้ำด้วยวิธีการเดียวกับครั้งที่ 1 อีกครั้ง จากนั้นนำไปกระจายเชื้อ โดยดึงตัวอย่าง 30 ไมโครลิตร ใส่ลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร NA นำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเลี้ยง พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างโคโลนีที่รอดชีวิต เพื่อนำไปตรวจสอบการเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยเลี้ยงในสูตรอาหารของ Grothe et al. (1999)

ครั้งที่ 3 นำเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำโดยการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน จำนวน 2 ครั้ง มาทำการเหนี่ยวนำซ้ำโดยใช้วิธีการแตกต่างกัน ได้แก่ การได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสารอะคริฟลาวิน (Acriflavin) การได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงร่วมกับสาร 5-โบรโมยูราซิล (5-Bromourasil) การได้รับสัมผัสสารอะคริฟลาวิน และการได้รับสัมผัสสาร 5-โบรโมยูราซิล

การเหนี่ยวนำซ้ำโดยการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสารอะคริฟลาวินหรือการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสาร 5-โบรโมยูราซิล จะใช้วิธีการเดียวกับครั้งที่ 1 จากนั้นนำไปกระจายเชื้อ โดยดึงตัวอย่าง 30 ไมโครลิตร ใส่ลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร NA นำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเลี้ยง พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างโคโลนีที่รอดชีวิต เพื่อนำไปตรวจสอบการเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยเลี้ยงในสูตรอาหารของ Grothe et al. (1999)

ส่วนการเหนี่ยวนำซ้ำโดยการได้รับสัมผัสสารอะคริฟลาวินหรือการได้รับสัมผัสสาร 5-โบรโมยูราซิล จะใช้สารที่ความเข้มข้น 50-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำไปกระจายเชื้อ โดยดึงตัวอย่าง 30 ไมโครลิตร ใส่ลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร NA นำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเลี้ยง พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างโคโลนีที่รอดชีวิต เพื่อนำไปตรวจสอบการเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยเลี้ยงในสูตรอาหารของ Grothe et al. (1999) โดยขั้นตอนของการเหนี่ยวนำซ้ำเชื้อแสดงดังภาพที่ 3-1

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 3-1 ขั้นตอนการเหนี่ยวนำซ้ำเชื้อสายพันธุ์เดิม (*A. latus* TISTR 1403/γ-2AA)

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ทำโดยเตรียมอาหารสูตรสำหรับผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อเริ่มต้นจำนวน 1 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 7 ของปริมาตรอาหารทั้งหมด ลงในแต่ละชุดการทดลอง ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 24

ชั่วโมง เพื่อศึกษาการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อพร้อมทั้งวิเคราะห์ผลโดยวัดค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยมีสภาวะที่ศึกษามีดังนี้

3.1 การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

ทำการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำ ในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 สูตร ได้แก่ DSMZ catalogue (1993), El-Sayed et al. (2009) และ Savenkova et al. (1999) ดังแสดงในตารางที่ 3-1 เพื่อเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตในสูตรอาหารที่แตกกันทั้ง 3 สูตร

ตารางที่ 3-1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตร ที่ใช้ในการศึกษา

องค์ประกอบ (กรัมต่อลิตร)	DSMZ catalogue, 1993	El-Sayed et al., 2009	Savenkova et al., 1999
Fructose	20	-	-
Sucrose	-	20	20
NH_4Cl	0.5	-	-
KH_2PO_4	2.3	1.5	0.2
Na_2HPO_4	2.3	-	-
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	0.2	0.41
$NaHCO_3$	0.5	-	-
$CaCl_2$	0.01	-	0.1
Ferric citrate	0.5	-	-
$(NH_4)_2SO_4$	-	2	-
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	-	9	-
$FeCl_2 \cdot H_2O$ *	-	60	-
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ *	-	10	-
NH_4NO_3	-	-	3
K_2HPO_4	-	-	0.64
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ *	-	-	10
Na-citrare	-	-	0.5
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ *	-	-	6
Trace element (ml/l)	5	1	-

* = mg/l

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.2 การศึกษาการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ทำการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำ ในสูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงที่สุดจากข้อที่ 3.1 ซึ่งได้รับการดัดแปลงโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนที่ความเข้มข้น 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร เพื่อเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ในสูตรอาหารที่ใช้กากน้ำตาลความเข้มข้นต่างกัน โดยใช้สูตรอาหารที่ได้ผลดีที่สุดจากข้อ 3.1 เป็นชุดควบคุม

3.3 การศึกษาการใช้น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ทำการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำ ในสูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงที่สุดจากข้อที่ 3.2 ซึ่งได้รับการดัดแปลงโดยใช้น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนที่ความเข้มข้น 2, 3 และ 4 กรัมต่อลิตร เพื่อเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ในสูตรอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้นต่างกัน โดยใช้สูตรอาหารที่ได้ผลดีที่สุดจากข้อ 3.2 เป็นชุดควบคุม

3.4 การศึกษาความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB

ทำการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำ ในสูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงที่สุดจากข้อ 3.3 โดยปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร เพื่อเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ในสูตรอาหารที่ใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นต่างกัน โดยใช้สูตรอาหารที่ได้ผลดีที่สุดจากข้อ 3.3 เป็นชุดควบคุม

4. การศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงสู่ระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

4.1 การผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch)

ทำการเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร โดยใช้สภาวะต่าง ๆ ที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3 เติมหัวเชื้อเริ่มต้นจำนวน $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 10 ลงในถัง โดยปริมาตรการทำงานทั้งหมดเท่ากับ 3 ลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1-2 ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของเหลวต่อนาที (vvm) ความเร็วใบพัดอยู่ในช่วง 100-200 รอบต่อนาที เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 60 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

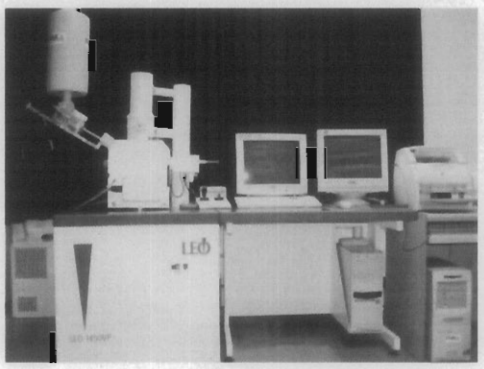
4.2 การผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ (fed-batch)

ทำการเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร โดยใช้สภาวะต่าง ๆ ที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3 ปริมาตร เติมหัวเชื้อเริ่มต้นจำนวน $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 10 ลงในถัง อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1-2 ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของเหลวต่อนาที (vvm) ความเร็วใบพัดอยู่ในช่วง 100-200 รอบต่อนาที เมื่อทำการหมักผ่านไปถึงช่วงปลายของการเจริญ (late log phase) ของเชื้อ ชั่วโมงที่ 18 จึงทำการเติมอาหารใหม่ (Feed medium) ที่มีความเข้มข้นของอาหารเท่ากับ 10 เท่า ที่อัตราการเติม (feed rate) เท่ากับ 79 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งคำนวณได้จากสูตร $F=F_0e^{\mu t}$ (ภาคผนวก ข) ทำการหมักต่อจนครบ 60 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

5. การศึกษาลักษณะสัณฐานของแบคทีเรีย

5.1 การส่องตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

นำตัวอย่างที่เตรียมไว้มาดึงน้ำออกจากเซลล์ (Dehydrate) โดยแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) แล้วนำตัวอย่างไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้ง ณ จุดวิกฤต (Critical point drying) ติดตัวอย่างลงบน Stub แล้วเคลือบด้วยทอง (ดัดแปลงจากวิธีของ Nunoy et al., 2011) จากนั้นนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รุ่น LEO 1450 VP บริษัท LEO (ภาพที่ 3-2)



ภาพที่ 3-2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รุ่น LEO 1450 VP บริษัท LEO

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5.2 การส่องตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

นำตัวอย่างที่เตรียมไว้มาดึงน้ำออกจากเซลล์ (Dehydrate) โดยแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) แล้วจึงนำตัวอย่างมาแช่ในสารผสมโพรไพลีนออกไซด์ (PO) 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที แล้วนำตัวอย่างไปฝังใน pure araldite 502 resin และนำไปอบ จากนั้นตัดด้วยเครื่องตัดตัวอย่าง (Ultramicrotome) และย้อมด้วย 5 เปอร์เซ็นต์ ยูรานิล อะซิเตท (uranyl acetate) ใน 70 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล (methanol) และ 1 เปอร์เซ็นต์ เลด ซิเตรท (lead citrate) ในน้ำอย่างละ 30 นาที ตามลำดับ (ดัดแปลงจากวิธีของ Nunoy et al., 2011) จากนั้นนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) รุ่น TECNAI 20 บริษัท Philips (ภาพที่ 3-3)

ภาพที่ 3-3 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน รุ่น TECNAI 20 บริษัท Philips

6. การตรวจสอบชนิดและปริมาณของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต (Ganzeveld et al., 1989)

การตรวจสอบชนิดและปริมาณของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ทำโดยนำตัวอย่างไประเหยแห้ง (Freeze dry) จากนั้นนำเซลล์แห้ง 10 มิลลิกรัม ละลายในคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสาร esterification fluid 1 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยกรดเบนโซอิก 0.025 กรัม เมทานอลปริมาตร 242 มิลลิลิตร และกรดซัลฟุริก เข้มข้นร้อยละ 95-98 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และนำไปบ่มในตู้บ่มควบคุมที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเก็บตัวอย่างที่เกิดจากการแยกชั้น โดยนำส่วนของคลอโรฟอร์มที่มี β-hydroxymethyl ester ละลายอยู่ นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรมิตรี (gas chromatography-mass spectrophotometry, GC-MS)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สภาวะของแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatograph) จะควบคุมโดยใช้อุณหภูมินำเข้าที่ 250 องศาเซลเซียส กำหนดให้อุณหภูมิของ Oven เริ่มต้นที่ 40 องศาเซลเซียส คงที่เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 70 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราการเพิ่ม 5 องศาเซลเซียสต่อนาที และอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นเป็น 115 องศาเซลเซียส มีอัตราการเพิ่ม 15 องศาเซลเซียสต่อนาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 190 องศาเซลเซียส ในอัตราการเพิ่ม 25 องศาเซลเซียสต่อนาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นจนถึง 250 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการเพิ่ม 10 องศาเซลเซียสต่อนาที กำหนดให้อุณหภูมิสุดท้าย (Post Run) คือ 250 องศาเซลเซียส คงที่เป็นเวลา 6 นาที คอลัมภ์ที่ใช้คือ HP-5MS, ความยาวเท่ากับ 30 เมตร ความหนาเท่ากับ 0.25 ไมโครเมตรและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.25 มิลลิลิตร

สภาวะของ Mass Spectrometer ควบคุมโดยใช้ ระบบ Electron Ionization: Acquisition mode; Sim mode ใช้ Detector ชนิด Electron multiplier detector กำหนดระบบ Solvent delay โดยใช้เวลา 4 นาที

สารมาตรฐานใช้สาร Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid], natural origin จาก Aldrich Product number 363502 เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข)

ในการวิเคราะห์กำหนดระบบการฉีดสารตัวอย่างแบบ Splitless ใช้ปริมาตรสารตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร

7. วิธีการวิเคราะห์ (ภาคผนวก ข)

การวิเคราะห์ข้อมูลในแต่ละการศึกษา จะทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยแต่ละชุดของการทดลองมีจำนวน 3 ซ้ำ ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. การวิเคราะห์มวลเซลล์แห้ง (Dry cell weight, DCW)
2. การวิเคราะห์ปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยวิธี Gravimetric method
3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีการ DNS assay (Miller, 1959)
4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

8. การคำนวณจลนพลศาสตร์ของการผลิต (เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์, 2551)

นำค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตที่ได้จากการศึกษามาคำนวณหาค่าดัชนีจลนพลศาสตร์ คือ สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากเซลล์(Yp/x) และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (Q_p)

1. สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) มีหน่วยเป็นกรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร

$$(Yx/s) = \frac{X-Xo}{So-S}$$

2. สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) มีหน่วยเป็นกรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร

$$(Yp/s) = \frac{P-Po}{So-S}$$

3. สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากเซลล์ มีหน่วยเป็นกรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์

$$(Yp/x) = \frac{P-Po}{X-Xo}$$

4. อัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ มีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

$$Qp = \frac{P}{t}$$

กำหนดให้

X_0 คือ ปริมาณเซลล์เริ่มต้น

X คือ ปริมาณเซลล์ที่เวลาที่สนใจ

S_0 คือ ปริมาณสารอาหารเริ่มต้น

S คือ ปริมาณสารอาหารที่เวลาที่สนใจ

P_0 คือ ปริมาณ PHB ที่แบคทีเรียผลิตได้เริ่มต้น

P คือ ปริมาณ PHB ที่แบคทีเรียผลิตได้ที่เวลาที่สนใจ

t คือ เวลา (ชั่วโมง)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University