

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. เชื้อจุลินทรีย์

Alcaligenes lactus TISTR 1403 ได้รับจาก จากศูนย์เก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์แห่งประเทศไทย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

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 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง SHIMADZU รุ่น UV-1601 UV-visible spectrophotometer
- 2.7 ตู้อบความร้อนสูง SHEL LAB รุ่น SL 1375 FX Sheldon manufacturing. Inc
- 2.8 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ HIRAYAMA รุ่น HA-300 MII
- 2.9 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ SHEL LAB รุ่น Sheldon manufacturing Model 1265 และ รุ่น YCW-04M
- 2.10 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ SHEL LAB รุ่น Sheldon manufacturing Inc. Model 1925
- 2.11 เครื่อง Sonicator Cole-Parmer รุ่น 8893
- 2.12 เครื่อง dispenser BioHT Rrolinc prosenser
- 2.13 ถังปฏิกรณ์ (Bioreactor) ปริมาตรบรรจุ 5 ลิตร B. Braun รุ่น Biostat B-5 บริษัท Biotech International ประเทศเยอรมัน
- 2.14 ปิเปตดูดสารปริมาณน้อย รุ่น BioHit ขนาด 20-200 μL และ 100-1000 μL
- 2.15 คิวเวตแก้ว Hellma ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
- 2.16 เตาแผ่นความร้อนไฟฟ้า imarflex รุ่น IF-830
- 2.17 ขวดเก็บตัวอย่าง

2.18 หลอดปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge tube)

2.19 คอลัมน์ HP-5MS ความยาว 30 เมตร หน้า 0.25 ไมโครเมตร

เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร

3.สารเคมี

3.1 Production Medium (ภาคผนวก ก.)

3.2 Trace Element Solution

3.3 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate)

3.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3.5 ไดโนโตรซาลิไซลิกแอซิด (DNS)

3.6 โพแทสเซียมโซเดียมทาเทรต ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

3.7 แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

3.8 แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)

3.9 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)

3.10 แอมโมเนียมอะซิเตรต ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)

3.11 ยูเรีย ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$)

3.12 สาร 2-aminoanthracene (2-AA)

3.13 สารมาตรฐาน Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid], natural origin

จาก Aldrich Product Number 363502

3.14 เอนไซม์อะไมเลส

3.15 กลูโคส

3.16 ฟรุคโตส

3.17 ซูโครส

3.18 น้ำตาลทรายแดงมิตรผล

3.19 น้ำตาลทรายขาวมิตรผล

3.20 น้ำตาลแร่ธรรมชาติมิตรผล

3.21 มอลโทเด็กซ์ทรินทางการค้า ร้านเบเกอร์รี่แลนด์

3.22 ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลัง

3.23 ไฮโดรไลเซทของแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 40

วิธีการดำเนินการวิจัย

ทำการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียโดยใช้การหริตด้วยการฉายรังสีแกมมา การใช้สาร 2-aminoanthracene (2-AA) และการฉายรังสีแกมมาร่วมกับการใช้สาร 2-aminoanthracene (2-AA) จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด PHB ได้สูง พร้อมทั้งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด PHB บนเครื่องเขย่า และนำผลการศึกษาที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียบนเครื่องเขย่า มาศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตพลาสติกชีวภาพในระดับถึงปฏิกิริยา ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมแบคทีเรีย

ถ่ายแบคทีเรีย *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 ซึ่งเก็บรักษาเชื้อบนอาหารวุ้นเยือก Nutrient agar ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ลงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB broth) ที่ประกอบด้วยเปปโตน (Peptone) 5 กรัมต่อลิตร และเนื้อสกัด (Beef extract) 3 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นซึ่งในทุกการทดลองใช้หัวเชื้อร้อยละ 3 ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในทุก ๆ การทดลอง

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรสำหรับผลิต PHB

โดยใช้อาหารสูตรสำหรับผลิต PHB คัดแปลงจาก Grothe et al. (1999) ซึ่งประกอบด้วย Glucose 20 กรัมต่อลิตร $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 1.5 กรัมต่อลิตร Na_2HPO_4 1.8 กรัมต่อลิตร $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 กรัมต่อลิตร และ สารละลายธาตุอาหารเสริม 1 มิลลิลิตรต่อลิตร ประกอบด้วย $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7\text{FeNO}_7$ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร H_3BO_3 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรด่างของอาหารเริ่มต้นเป็น 7 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยแยกนึ่งฆ่าเชื่อน้ำตาลกลูโคสในสภาวะเดียวกับที่กล่าวข้างต้น ใส่น้ำตาลกลูโคสที่นึ่งฆ่าเชื้อลงในสารละลายอาหารให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร

2.2. การเตรียมไอโครไลเซทของกากมันสำปะหลัง

นำกากมันสำปะหลังแห้งบดละเอียดความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บรรจุในถังปฏิกรณ์ขนาด 10 ลิตร เติมเอนไซม์อะไมเลสให้มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลังแห้ง) กวนผสมให้เข้ากัน ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำมารองแยกส่วนของเหลวที่ได้จากการย่อยสลายเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายคำนวณได้จาก

$$\text{ผลได้ (yield) (\%)} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อย (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ปริมาณกากมันสำปะหลัง (กรัมต่อลิตร)}} \times 100$$

3. การทรีตแบคทีเรียด้วยรังสีแกมมา การใช้สาร 2-aminoanthracene และรังสีแกมมา ร่วมกับใช้สาร 2-aminoanthracene

ทำโดยเตรียมสูตรอาหาร NB ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารบรรจุอยู่ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเชื้อแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 ที่เก็บรักษาไว้ในอาหารวุ้นเอียงลงในอาหารที่เตรียมไว้เพื่อเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น โดยเลี้ยงแบคทีเรียบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องในความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 ชั่วโมง และนำแบคทีเรียที่ผ่านการเลี้ยงมาปั่นเหวี่ยงเพื่อทำให้เซลล์ตกตะกอนในความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงล้างเซลล์อีกครั้งด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และนับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย นำเซลล์ตัวอย่างจากที่นับได้ มาจำนวน 1,000 เซลล์ ค่อน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำมาผสมลงในน้ำกลั่นปริมาตร 9 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นทำการทรีตด้วย

1. ฉายรังสีแกมมาโดยใช้เครื่องฉายรังสี Mark I จากธาตุซีเซียม 137 ปรับค่าปริมาณรังสีเท่ากับ 2, 4, 6, 8 และ 10.0 Gy

2. ใส่สาร 2-aminoanthracene ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเขย่าให้เข้ากันตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สำหรับการใช้รังสีแกมมา ร่วมกับใช้สาร 2-aminoanthracene ทำโดยคัดเลือกแบคทีเรียที่ได้รับรังสีแกมมาแล้วนำมาทรีตด้วยสาร 2-aminoanthracene อีกครั้ง

จากนั้นนำแบคทีเรียที่ผ่านการทรีตเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยง โดยการ spread ลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร NA นำไปบ่มเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ พร้อมทั้งเก็บ

ตัวอย่างโคโลนีของแบคทีเรียที่มีขนาดใหญ่ที่สุด เพื่อนำมาใช้ในการทดลองต่อไป โดยในการทดลองจะใช้ชื่อเรียกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการทรีดแบคทีเรียด้วยรังสีแกมมา ใช้สาร 2-aminoanthracene และรังสีแกมมาพร้อมกับใช้สาร 2-aminoanthracene ว่า *A. lactus* TISTR 1403/ γ , *A. lactus* TISTR 1403/2AA และ *A. lactus* TISTR 1403/ γ -2AA ตามลำดับ

4. การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย

ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการทรีดโดยการฉายรังสีแกมมา การใช้สาร 2-aminoanthracene (2-AA) และการฉายรังสีแกมมาพร้อมกับการใช้สาร 2-AA เปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์เดิม โดยเลี้ยงในสูตรอาหารสำหรับผลิต PHB ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อบรรจุอยู่ 150 มิลลิลิตร เดิมหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 3 ของอาหาร ลงในแต่ละชุดการทดลอง เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 84 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรีย และวิเคราะห์ผลโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พร้อมทั้งหาคำนวน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณไนโตรเจน

5. การศึกษาสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB

ศึกษาสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB ของแบคทีเรียในอาหารสูตรอาหารสำหรับผลิต PHB โดยเดิมหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 3 ของอาหาร ลงในแต่ละชุดการทดลอง เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2) ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรีย และวิเคราะห์ผลโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พร้อมทั้งหาคำนวน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณไนโตรเจน ทำการศึกษาดังนี้

5.1 การศึกษาผลของการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียในสูตรอาหารสำหรับผลิต PHB ซึ่งใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส (Lab grade) ซูโครสทางการค้า (น้ำตาลทรายขาวมิตรผล น้ำตาลทรายแดงมิตรผล น้ำตาลแร่ธรรมชาติมิตรผล) มอลโทเด็กซ์ทรินทางการค้า ไฮโดรไลเซตของแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 40 และไฮโดรไลเซตของกากมันสำปะหลังร้อยละ 10 โดยปรับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร

5.2 การศึกษาความเข้มข้นของไฮโดรไลเซตของกากมันสำปะหลังที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงแบคทีเรียในสูตรอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซตของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน โดยปรับปริมาณของส่วนผสมเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 30, 40, 50, 60 และ 70 ของปริมาณอาหาร เปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส

5.3 การศึกษาเปรียบเทียบชนิดของแหล่งไนโตรเจน

โดยใช้แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมอะซิเตรท และยูเรีย โดยปรับความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 1.4 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน

5.4 การศึกษาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C: N)

ศึกษาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย โดยทำการเติมแหล่งไนโตรเจน คือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับไฮโดรไลเซตของกากมันสำปะหลังเข้มข้นร้อยละ 50 ที่อัตราส่วน C:N ratio เท่ากับ 15, 21.4, 30, 60 และ 300 เปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน

5.5 การศึกษาผลของความเป็นกรดต่าง

ศึกษาผลของความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย ทำโดยปรับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 6.0, 6.5, 7.0, และ 8.0

6. การศึกษาความสามารถในการผลิต PHB ในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ใช้สภาวะเหมาะสมต่าง ๆ ที่ได้จากการศึกษาในข้อ 5 โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 เติมน้ำในอาหารสำหรับการผลิต PHB ปริมาตร 3 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งกำหนดให้ความเร็วใบพัดอยู่ในช่วง 100-200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1-2 ปริมาตรของอากาศ/ปริมาตรของเหลว/นาที่ (vvm) เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ และปริมาณ PHB ที่เซลล์ผลิตได้

7. การตรวจสอบชนิดและปริมาณของ PHB

การตรวจสอบชนิดและปริมาณของ PHB ทำโดยนำตัวอย่างเซลล์แบคทีเรียไปประเหยแห้ง (Freeze dry) จากนั้นนำเซลล์แห้ง 10 มิลลิกรัม ละลายในคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติม

สาร esterification fluid 1 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยกรดเบนโซอิก 0.5 กรัม เมทานอลปริมาตร 242 มิลลิลิตร และกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 95-98 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร พร้อมทั้งผสมให้เข้ากัน เก็บตัวอย่างที่เกิดการแยกชั้นของสารออร์แกนิก (organic phase) โดยเก็บสารชั้นของสารเอควียส (aqueous phase) ซึ่งเป็นส่วนของคลอโรฟอร์มที่มี β -hydroxymethyl ester ละลายอยู่ นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมทรี (gas chromatography-mass spectrophotometry, GC-MS) โดยดัดแปลงวิธีการจาก Ganzeveld et al. (1989)

สถานะของแก๊สโครมาโทกราฟี (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 (Transfer line temperature) คือ 250 องศาเซลเซียส คงที่เป็นเวลา 6 นาที คอลัมน์ที่ใช้คือ HP-5MS, ความยาวเท่ากับ 30 เมตร ความหนาเท่ากับ 0.25 ไมโครเมตรและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 0.25 มิลลิเมตร

สถานะของ Mass Spectrometer ควบคุมโดยใช้ระบบ Electron Ionization: Acquisition mode; Sim mode ใช้ Detector ชนิด Electron multiplier detector กำหนดระบบ Solvent delay โดยใช้เวลา 4.0 นาที

สำหรับสารมาตรฐานใช้สาร 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

วิธีการวิเคราะห์

ในการวิเคราะห์ข้อมูลในแต่ละการศึกษา จะทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยทำการทดลองซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีต่าง ๆ ดังนี้

1. วัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance)

วัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำหมักจากการเลี้ยงแบคทีเรีย โดยเจือจางตัวอย่าง 10 เท่า (ตัวอย่างน้ำหมัก 1 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงคำนวณจาก

ค่าการดูดกลืนแสง = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร x อัตราการเจือจาง

2. การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight, DCW)

นำตัวอย่างน้ำหมัก 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดปั่นเหวี่ยง (ผ่านการอบแห้งและชั่งน้ำหนัก) ขนาด 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใส (Supernatant) ทิ้ง จากนั้นนำตะกอนเซลล์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีการ DNS assay (Miller, 1959)

นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงน้ำหมักจากการเลี้ยงแบคทีเรีย มาทำการเจือจางให้เหมาะสม จากนั้นเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร พร้อมทั้งผสมให้เข้ากัน และนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำเย็น เป็นเวลา 5 นาที และเติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยคำนวณเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ภาคผนวก ข)

4. วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน

นำส่วนใสที่ได้จากปั่นเหวี่ยงน้ำหมักจากการเลี้ยงแบคทีเรีย มาทำการเจือจางให้เหมาะสม จากนั้นทำการวิเคราะห์โดยวิธี Phenol-hypochlorite (Weatherburn, 1967) โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นสารมาตรฐาน (ภาคผนวก ข)

5. ทดสอบแบคทีเรียที่มีการผลิต PHB โดยใช้ sudan black B

นำแบคทีเรียมาเกลี่ยในอาหารวุ้นสังเคราะห์ (Production medium agar) ปุ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนเกิดเป็น โคโลนี นำโคโลนีที่ได้มาเกลี่ยในสไลด์ที่สะอาด รอให้แห้ง นำมาผ่านไฟ แล้วย้อมสีด้วย sudan black B (sudan black B 0.3 กรัมในเอทิลแอลกอฮอล์ 100 มิลลิลิตร) 5-10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ล้างให้น้ำไหลผ่าน และทำให้สไลด์แห้ง หยด xylene และ safranin ไว้

5-10 นาที ล้างน้ำและรอให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จุลินทรีย์ที่มีการผลิตลิพิดภายในเซลล์ ซึ่งอาจจะเป็น PHB จะติดสีดำของ sudan black B (Burdon, 1946)

6. การวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบีวทิเรต

การวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบีวทิเรต สามารถทำได้ โดยใช้การวิเคราะห์ด้วยวิธี Gravimetric method (Groth et al., 1999; Dong & Sun, 2000) นำตัวอย่างน้ำหนักจากการเลี้ยงแบคทีเรีย ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่อบฆ่าเชื้อและรู้ค่าน้ำหนักหลอดเปล่า จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงในความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร พร้อมทั้งผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มในอ่างควบคุมความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงในความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นใส่สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ (ทางการค้าที่มีส่วนผสมของคลอรีนร้อยละ 6) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อล้างส่วนของตะกอนที่ได้ และนำไปปั่นเหวี่ยงในความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1.2 มิลลิลิตรอีกครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงในความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง โดยตะกอนเซลล์สุดท้ายนำไปปั่นแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำมาชั่งน้ำหนัก น้ำหนักของหลอดที่มีส่วนตะกอนอยู่ลบด้วยน้ำหนักของหลอดเปล่า ซึ่งจะได้เป็นค่าน้ำหนักที่แท้จริงของปริมาณพลาสติกชนิด PHB ที่แบคทีเรียผลิตได้

7. การคำนวณจลนพลศาสตร์ของการผลิต

นำค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาล และปริมาณ PHB ที่ได้จากการศึกษามาคำนวณหาค่าดัชนีจลนพลศาสตร์ ดังนี้คือ สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร ($Y_{x/s}$) สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร ($Y_{p/s}$) และสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB ($Y_{p/x}$) จากเซลล์

1. สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร ($Y_{x/s}$) มีหน่วยเป็นกรัมต่อกรัมของปริมาณสารอาหารที่ใช้ไป

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

2. สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร ($Y_{p/s}$) มีหน่วยเป็นกรัมต่อกรัมของปริมาณสารอาหารที่ใช้ไป

$$(Y_{p/s}) = \frac{P - P_o}{S_o - S}$$

3. สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB ($Y_{p/x}$) จากเซลล์ มีหน่วยเป็นกรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง

$$(Y_{p/x}) = \frac{P - P_o}{X - X_o}$$

กำหนดให้

X_o คือปริมาณเซลล์เริ่มต้น

X คือปริมาณเซลล์ที่เวลาที่สนใจ

S_o คือปริมาณสารอาหารเริ่มต้น

S คือปริมาณสารอาหารที่เวลาที่สนใจ

P_o คือปริมาณ PHB ที่แบคทีเรียผลิตได้เริ่มต้น

P คือปริมาณ PHB ที่แบคทีเรียผลิตได้ที่เวลาที่สนใจ