2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุอุปกรณ์

1. กากน้ำตาล จากโรงงานน้ำตาลบางกระทุ่ม จ.พิษณุโลก(พฤศจิกายน 2553)
2. น้ำแช่ข้าวโพด จากโรงงานคิงสตาร์ช อ.พัฒนานิคม จ.ลพบุรี (พฤศจิกายน 2553)
3. เชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ จาก DSMZ ประเทศเยอรมัน (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 ชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

Microorganisms	code	gram	advantage
Bacillus megaterium	90	+	- survive in some extreme conditions
Alcaligenes eutrophus	531	–	- survive in sediments that contain millimolar concentrations of toxic heavy metals. - oxidize hydrogen to water for energy. - limited essential nutrients such as N or P
Azotobacter vinelandi	720	–	nitrogen fixing while grown aerobically
Ralstonia eutropha	1105	–	It can nurture on hydrogen as the sole energy source.
Azohydromonas lata	1123	–	nitrogen-fixing and hydrogen autotrophic monad

อุปกรณ์

1. Erlenmeyer flask 250 ml with 3 bottom baffles (Sigma Inc.)
2. Erlenmeyer flask 1000 ml with 3 bottom baffles (Sigma Inc.)
3. Whatman filter paper No.1
4. Pipette HBG
5. Volumetric flask Pyrex
6. Cylinder Pyrex

เครื่องมือ

1. หม้อต้มไอน้ำ 2 ชั้น (kettle) ขนาดบรรจุ 60 ลิตร ของภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

2. เครื่องระเหยน้ำแบบสูญญากาศ (vacuum evaporator) ขนาดบรรจุ 60 ลิตร ของภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

3. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง	Precisa 240A ,Swiss Quality
4. pH meter	713 ,Metrohm
5. Micropipette	Pipettman ,Gilson
6. Spectrophotometer	Novaspec II ,Pharamacia Biotech
7. Hot plate stirrer	M22/1 ,Framo-Geratetechnick
8. Pump	GAST
9. Shaker	Innova 4340 ,New Brunswick scientific
10. Homogenizer	Ultra-Turrax T25 ,J&K Ika-Labortechnik
11. Lyophilizer (Freeze Dryer)	Flexi-Dry μp ,FTS systems
12. Rotary evaporator with water bath	Labo Rota 300 ,Resona
13. Centrifuge	Sorvall Dupont
14. Autoclave	HA 300MN ,Harayama
15. Gel permeation chromatography (GPC)	Waters 410E USA
16. Neuclear magnetic resonance (NMR)	Avance 400 ,Bruker
17. Transmission Electron Microscope (TEM)	CEM 902, Zeiss

สารเคมี

1. น้ำแช่ข้าวโพด (Corn steep liquor)	Sigma
2. Poly-(3-R-hydroxybutyric acid)	Fluka
3. Fructose	Fisher Scientific
4. NH_4Cl	Merck
5. KH_2PO_4	Merck
6. Na_2HPO_4	Merck
7. $MgSO_4.7H_2O$	Fisher Scientific
8. $NaHCO_3$	Fisher Scientific
9. Ferric citrate	Fluka
10. $CaCl_2$	Unilab(APS)
11. $ZnSO_4.7H_2O$	Ajax Finechem
12. $MnCl_2.4H_2O$	Ajax Finechem
13. H_3BO_4	Fisher Scientific
14. $CoCl_2.7H_2O$	Fluka

15. $CuCl_2.2H_2O$ Fluka

16. $NiCl_2.6H_2O$ Fluka

17. $NaMo_4.2H_2O$ AnalaR (BDH)

18. Chloroform Merck

19. Absolute ethanol Merck

20. Sudan หรือ Sudan Black B Fluka

22. ARAL (Modified Bisphenol A Epoxy) EMS (electron Microscopy Science)

23. Dodenyl succinic Anhydride (DDSA) EMS(electron Microscopy Science)

24. 2,4,6 -Tri(Dimethylamine ethyl)phenol (DMP) EMS (electron Microscopy Science)

25. Glutaraldehyde Fluka

26. Xylene, Methylene blue, Safranine, Oil immersion Fluka

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ DSMZ medium catalogue 1993 :

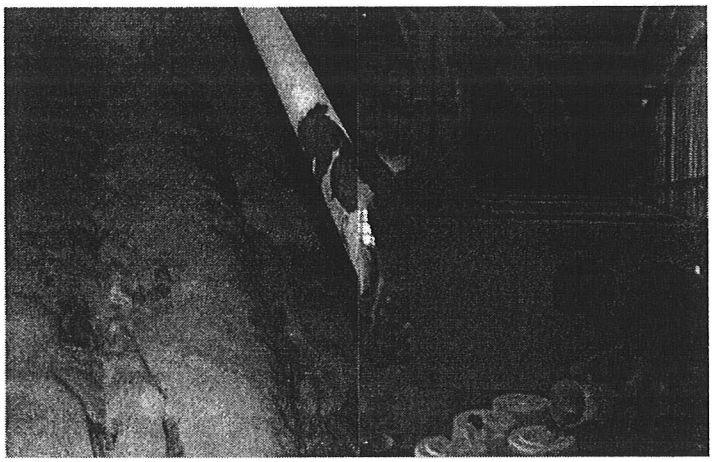
Fructose	20.0 g/l
NH_4Cl	0.5 g/l
KH_2PO_4	2.3 g/l
Na_2HPO_4	2.3 g/l
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 g/l
$NaHCO_3$	0.5 g/l
Ferric citrate	0.05 g/l
$CaCl_2$	0.01 g/l

Trace element 5 ml ($ZnSO_4.7H_2O$ 0.01 ,$MnCl_2.4H_2O$ 0.003 ,H_3BO_4 0.003 ,$CoCl_2.7H_2O$ 0.02 ,$CuCl_2.2H_2O$ 0.001 ,$NiCl_2.6H_2O$ 0.002 ,$NaMo_4.2H_2O$ 0.003)

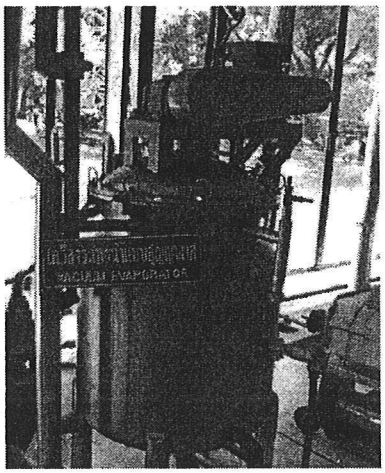
2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การบำบัดน้ำแช่ข้าวโพด

นำน้ำแช่ข้าวโพดจากโรงงานคิงสตาร์ อ.พัฒนานิคม จ.ลพบุรี ตักใส่ถังขนาด 20 ลิตร จำนวน 8 ถัง ด้วยบีกเกอร์พลาสติก 5000 ml (รูปที่ 3.1) นำมาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยให้มีของแข็งที่ละลายอยู่ในน้ำ 50% โดยทำให้ระเหยโดยใช้เครื่องระเหยน้ำแบบสูญญากาศ (vacuum evaporator) ปริมาตรบรรจุ 40 ลิตร (รูปที่ 2.1) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสใช้เวลาประมาน 1.30 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดของแข็งที่ละลายในน้ำด้วย Refractometer



รูปที่ 2.1 การเก็บน้ำแช่ข้าวโพดจากโรงงานผลิตแป้งข้าวโพด



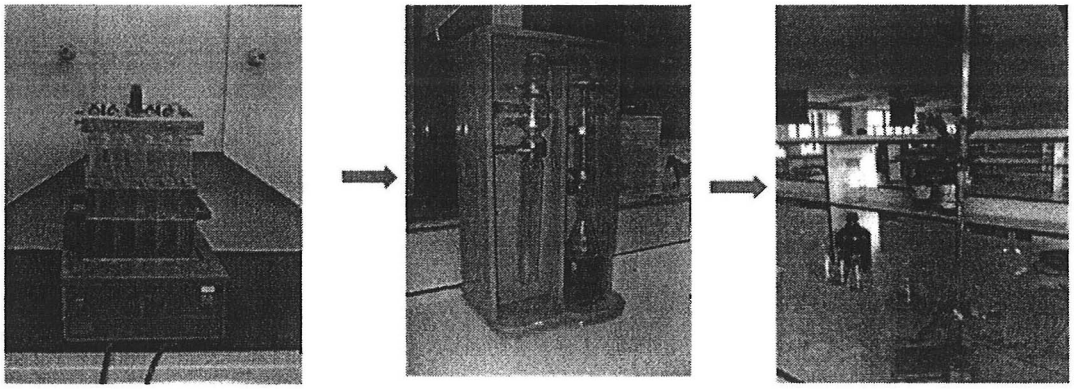
รูปที่ 2.2 เครื่องระเหยน้ำแบบสูญญากาศ (Vacuum evaporator)

การวิเคราห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Micro-Kjedahl

น้ำแช่ข้าวโพดที่ทำให้เข้มข้นจนมีปริมาณของแข็งละลายได้ 50% ถูกนำมาวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธี Micro-Kjedahl ซึ่งมี 3 ขั้นตอนคือ การสกัด การกลั่น และการไตรเตรต (รูปที่ 2.3) จากนั้นนำปริมาณที่ใช้ในการไตรเตรตมาคำนวณตามสูตรเพื่อหาปริมานร้อยละของไนโตรเจน และนำค่าที่ได้นี้ไปคูณกับค่าจำเพาะของชนิดโปรตีนธัญพืช (6.25) เพื่อหาร้อยละของโปรตีนในสารตัวอย่าง สูตรคำนวณด้านล่าง

$$N\% = \frac{14.007 \times \text{HCl conc.(N)} \times \text{(vol.of Titration)}}{\text{sample (g)}}$$

$$\text{Protein (\%)} = N\% \times 6.25$$



Extraction Distillation Titration

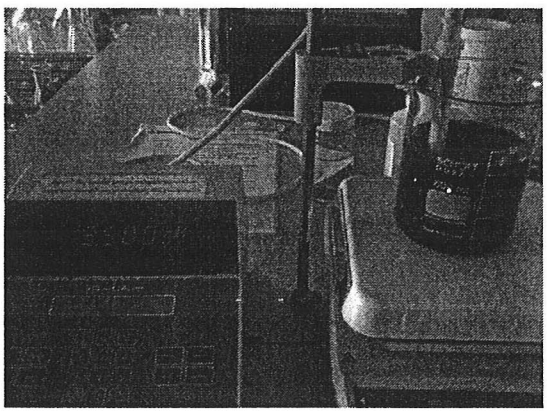
รูปที่ 2.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Micro-Kjedahl

วิธีเตรียมน้ำแช่ข้าวโพด

น้ำแช่ข้าวโพดที่ถูกทำให้เข้มข้นแล้ว นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 20% (w/v) ปรับ pH เป็น 6.8 ด้วย 10N NaOH จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 10°C นาน 10 นาที เพื่อแยกตะกอนทิ้ง ส่วนสารละลายใสนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อผสมรวมกับองค์ประกอบอื่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในตู้ปราศจากเชื้อ (laminar flow)

2.2.2 การบำบัดกากน้ำตาล

กากน้ำตาลถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 25% (w/v) ไฮโดรไลซ์ด้วยกรดโดยการปรับ pH ของสารละลายเป็น 3.5 ด้วย 5M H_2SO_4 อุณหภูมิ 60°C ปั่นกวนตลอดเวลานาน 2 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับ pH 7.00 ด้วย 10N NaOH ก่อนนำไปแยกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 10°C นาน 10 นาที (รูปที่ 2.4) ส่วนสารละลายใสนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อผสมรวมกับองค์ประกอบอื่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในตู้ปราศจากเชื้อ (laminar flow)



รูปที่ 2.4 การไฮโดรไลซ์กากน้ำตาลด้วยด้วยกรดเจือจาง

2.2.3 วิธีเตรียมอาหารสูตร DSMZ medium (DSMZ catalogue, 1993)

ทั้งน้ำตาลที่เป็นแหล่งคาร์บอน น้ำแช่ข้าวโพดที่เป็นแหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของ mineral และ trace จะเตรียมแยกขวดกันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ก่อนนำมาผสมกันทั้งหมดในตู้ปราศจากเชื้อ (laminar flow) เพื่อนำไปเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไป

วิธีการเตรียม Mineral

แร่ธาตุแต่ละชนิดเตรียมแยกขวด โดยเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10 เท่าเมื่อนำไปผสมกับส่วนอื่นๆ จะลดปริมาตรลงตามส่วนแต่ต้องมีความเข้มข้นสุดท้ายตามสูตรก่อนนำไปใช้ ดังนี้

1. NH_4Cl 1.0/L ชั่งมา 10g เติมน้ำเป็น 200 ml
2. $MgSO_4$ 0.5/L ชั่งมา 5g เติมน้ำเป็น 200 ml
3. $Fe(NH_4)$ 0.05g/L ชั่งมา 0.5g เติมน้ำเป็น 200 ml (ไม่ละลายที่อุณหภูมิห้อง ต้องนำไปนึ่ง)
4. KH_2PO_4 23g + $CaCl_2$ 0.1g เติมน้ำเป็น 200 ml
5. Na_2HPO_4 29 g/l + $NaHCO_3$ 5 g/l เติมน้ำเป็น 200 ml (ห้ามเก็บไว้ในที่เย็นจะตกตะกอน)

วิธีเตรียม Trace

รวมสารเคมีที่ใช้เตรียม trace ทุกตัวในขวดเดียวกัน ให้มีความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 1 ลิตร เมื่อนำไปใช้จะลดปริมาตรลงตามส่วน

2.2.4 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดต่างๆ เพื่อผลิต PHB

แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus megaterium Alcaligenes eutrophus Azotobacter vinelandi Ralstinia eutropha* และ *Azohydromonas lata* ซึ่งถูกเก็บไว้ในแอมพูลภาพผงแช่แข็ง ถูกนำมากระตุ้นการทำงานโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 h โดยให้เจริญในอาหารเหลวสูตร DSMZ (DSMZ catalogue, 1993) มีน้ำตาลฟรุคโตส 2% pH ของอาหาร 7.0 เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตก่อนทำการศึกษาโดยใช้กากน้ำตาลแทนฟรุคโตส และใช้น้ำแช่ข้าวโพดแทนแอมโมเนียมคลอไรด์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ใช้วิธีเลี้ยงแบบครั้งเดียว (Batch fermentation) โดยเลี้ยงใน baffled flask with 3 bottom baffles ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีปริมาตรอาหาร 150 มิลลิลิตร เลี้ยงในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าภายใต้การควบคุมอุณหภูมิ 30°C ความเร็วรอบ 130 rpm เป็นเวลา 48-68 ชั่วโมง (รูปที่ 2.5)

2.2.5 การเพาะเลี้ยง *Bacillus megaterium*

การหาปริมาณที่เหมาะสมของกากน้ำตาลและน้ำแช่ข้าวโพด เพื่อใช้เป็นสูตรอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรียให้สามารถผลิต PHB ได้ปริมาณมาก เริ่มจากการเพาะเลี้ยง *B. megaterium* ในอาหารที่มีการแปรผันความเข้มข้นของทั้ง 2 ชนิด ดังนี้

1. DSMZ medium เพื่อหาช่วง Exponential phase ของจุลินทรีย์เปรียบเทียบแต่ละสายพันธุ์ในการทำเชื้อเริ่มต้น (inoculum)
2. DSMZ medium ที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 1-6 เป็นแหล่งคาร์บอนแทนฟรุคโตส จำนวน 6 สูตรดังนี้

   ร้อยละ 1 ของกากน้ำตาลแทนน้ำตาลฟรุคโตสของสูตร DSMZ
   ร้อยละ 2 ของกากน้ำตาลแทนน้ำตาลฟรุคโตสของสูตร DSMZ
   ร้อยละ 3 ของกากน้ำตาลแทนน้ำตาลฟรุคโตสของสูตร DSMZ
   ร้อยละ 4 ของกากน้ำตาลแทนน้ำตาลฟรุคโตสของสูตร DSMZ
   ร้อยละ 5 ของกากน้ำตาลแทนน้ำตาลฟรุคโตสของสูตร DSMZ
   ร้อยละ 6 ของกากน้ำตาลแทนน้ำตาลฟรุคโตสของสูตร DSMZ

3. DSMZ medium ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเหมาะสมที่สุดในการผลิต PHB ร่วมกับน้ำแช่ข้าวโพดร้อยละ 2-6 ที่เป็นแหล่งไนโตรเจนแทน NH_4Cl จำนวน 3 สูตรดังนี้

   ร้อยละ 2 ของน้ำแช่ข้าวโพดกับร้อยละของกากน้ำตาลที่เหมาะสม
   ร้อยละ 4 ของน้ำแช่ข้าวโพดกับร้อยละของกากน้ำตาลที่เหมาะสม
   ร้อยละ 6 ของน้ำแช่ข้าวโพดกับร้อยละของกากน้ำตาลที่เหมาะสม

ตารางที่ 2.2 สรุปสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง *B. megaterium* เพื่อผลิต PHB

C and N sources	Concentration (%)	
Molasses	1% Molasses	0.5 g/L NH_4Cl
	2% Molasses	0.5 g/L NH_4Cl
	3% Molasses	0.5 g/L NH_4Cl
	4% Molasses	0.5 g/L NH_4Cl
	5% Molasses	0.5 g/L NH_4Cl
	6% Molasses	0.5 g/L NH_4Cl
Corn steep liquor	4% Molasses	2% Corn steep liquor
	4% Molasses	4% Corn steep liquor
	4% Molasses	6% Corn steep liquor

2.2.6 การเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus*

ทำการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ในอาหารที่มีกากน้ำตาลและน้ำแช่ข้าวโพดในปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งได้จากการทดลองเพาะเลี้ยงใน *B. megaterium* เพื่อหาอัตราการเจริญเติบโตและการผลิต PHB เปรียบเทียบประสิทธิภาพกับการใช้น้ำข้าวโพดตัวอย่างและน้ำข้าวโพดทางการค้า และเพื่อ

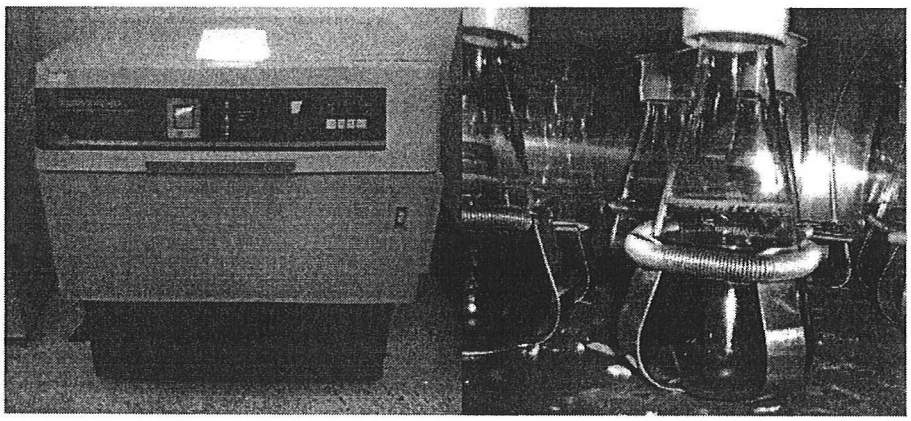
ยืนยันอัตราส่วนความเข้มข้นของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงดังกล่าว จึงได้ทดลองเลี้ยง *A. eutrophus* อีกครั้ง ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาล 4% (w/v) และแปรผันปริมาณน้ำแช่ข้าวโพด 0-6% (w/v) เลี้ยงในฟลาสขนาด 250 มิลลิลิตร มีปริมาตรอาหาร 150 มิลลิลิตร ภายในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็ว 130 rpm อุณหภูมิ 30°C นาน 68 h

2.2.7 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ

เมื่อได้ปริมาณกากน้ำตาลและน้ำแช่ข้าวโพดที่เหมาะสม (กากน้ำตาล 4% และน้ำแช่ข้าวโพด 4%) เพื่อเป็นสูตรอาหารในการผลิต PHB จึงทำการทดลองเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในสูตรอาหารดังกล่าว และภายใต้สภาวะการผลิตที่เหมาะสมเปรียบเทียบผลผลิตกัน

2.2.8 ขยายขนาดการผลิต

ทำการเพาะเลี้ยง *B. megaterium* และ *A. eutrophus* ซึ่งให้อัตราการผลิต PHB สูงกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาลและน้ำแช่ข้าวโพดเหมาะสม โดยขยายขนาดการผลิตในถังหมัก 500 ml 1000 ml และ 2 L โดยใช้ปริมาตรอาหารเหลว 250 ml 600 ml และ 1000 ml ตามลำดับ ภายในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็ว 130 rpm อุณหภูมิ 30°C นาน 68 h

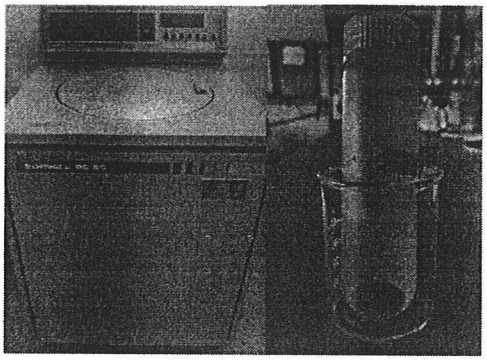


รูปที่ 2.5 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)

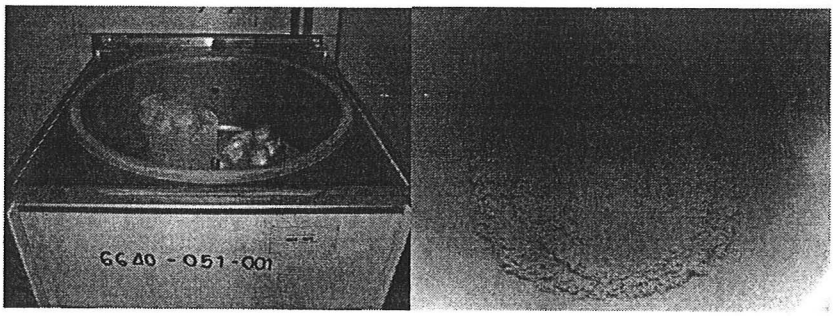
2.2.9 วิธีการเก็บเกี่ยวเซลล์ (Cell harvest)

ทำการเก็บเซลล์ทุก 6 ชั่วโมง โดยนำเซลล์ที่อยู่ในอาหารเหลวไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนของเหลว และนำส่วนของเซลล์ที่ก้นหลอดไปทำแห้ง (รูปที่ 2.6) โดยกระบวนการ Lyophilization ด้วยเครื่อง Freeze Dryer เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (รูปที่ 2.7)

เมื่อได้เซลล์แห้งของจุลินทรีย์ นำไปชั่งน้ำหนักและบันทึกผล ควรนำหลอดเปล่าสำหรับปั่นไปชั่งน้ำหนักก่อนทุกครั้ง เพื่อนำไปหักลบกับน้ำหนักสุดท้ายที่มีเซลล์แห้งบรรจุอยู่ ทำการบันทึกผล



รูปที่ 2.6 การตกตะกอนเซลล์ด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยง (centrifugation)



รูปที่ 2.7 การทำแห้งเซลล์โดยใช้ความเย็นในการระเหิด (Lyophilization) ด้วยเครื่อง Freeze Dryer

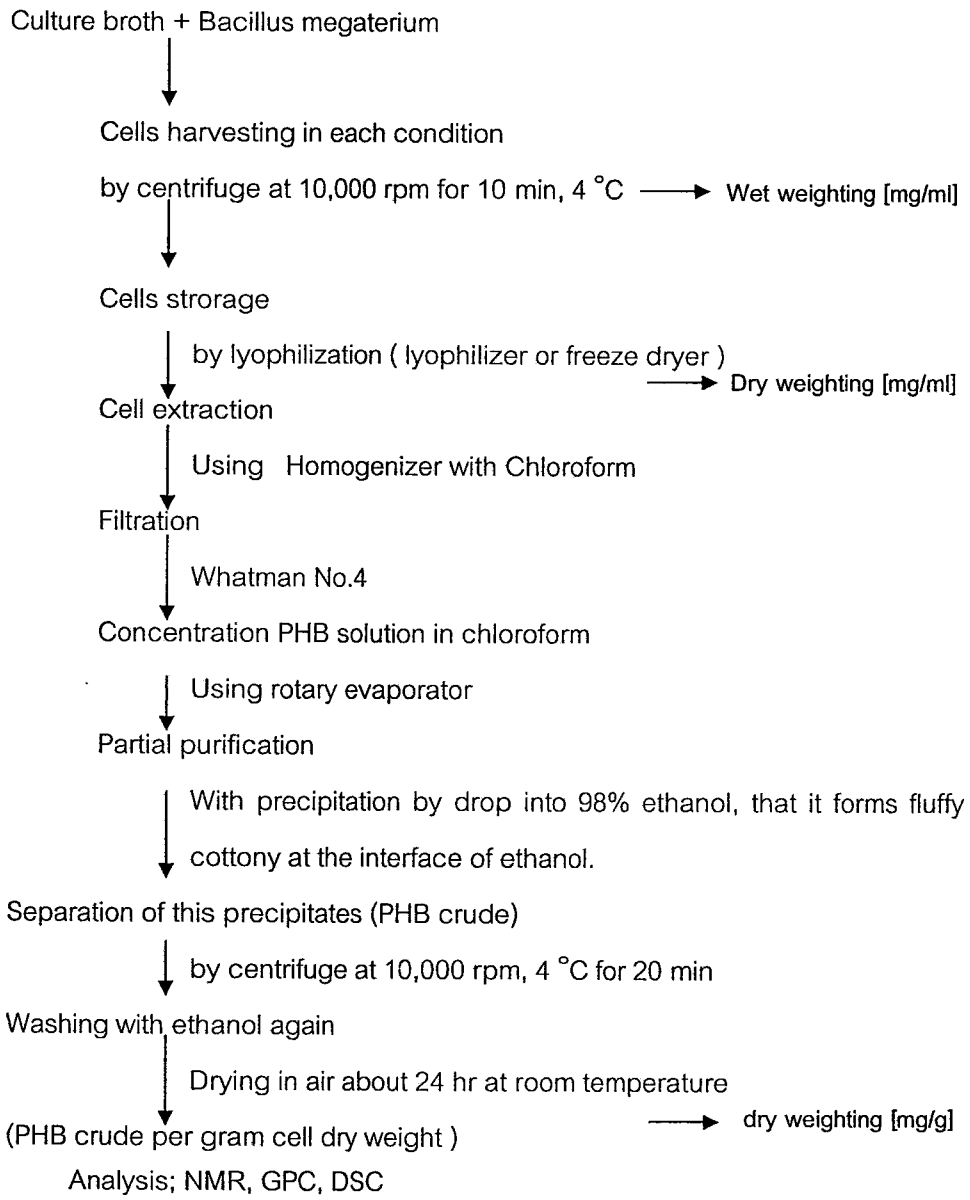
2.2.10 วิธีการแตกเซลล์เพื่อสกัด PHB (Cell debris for PHB extraction)

วิธีการเพื่อสกัด PHB ออกจากเซลล์ โดยทั่วไปจะสกัดด้วย Soxlet apparatus เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง โดยใช้ตัวทำละลาย Chloroform หรือสารละลาย Sodium hypochlorite หรือสารละลายทั้ง 2 ชนิด ร่วมกันเป็นตัวสกัด PHB ออกมา (Hahn et al., 1994)

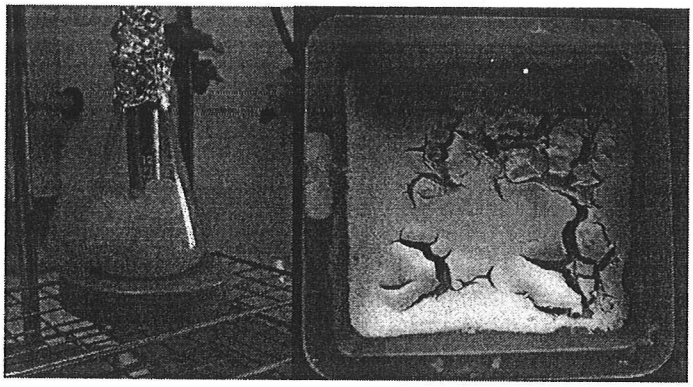
ส่วนในการศึกษานี้จะใช้เครื่องบดเซลล์ (Homogenizer) และตัวทำละลาย Chloroform เป็นตัวละลาย PHB ออกมาจากเซลล์จุลินทรีย์ โดยอาศัยหลักการของการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่ง PHB นั้นจะสามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารละลาย Chloroform ได้ เพราะ PHB เป็นสารในกลุ่มของกรดไขมันที่มีหมู่ไฮดรอกซิลจับอยู่ (Hydroxy fatty acid) (Rehm, 2003) โดยมีวิธีการดังนี้

1. ปั่นเซลล์แห้งในตัวทำละลาย Chloroform ด้วย Homogenizer ความเร็ว 13,500 rpm นาน 10 นาที
2. จากนั้นกรองแยกเศษเซลล์ที่อยู่ในตัวทำละลาย Chloroform ด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1

3. นำตัวทำละลาย Chloroform ที่ผ่านการกรองมาทำให้เข้มข้น (Concentration) ด้วยเครื่อง Rotary evaporator จนสารละลาย Chloroform หนืด
4. นำตัวทำละลาย Chloroform หนืดที่ได้ หยดลงในสารละลาย Absolute ethanol เพื่อทำให้ PHB ตกตะกอนออกมา ซึ่งจะเห็นเป็นตะกอนขุ่นขาว
5. นำตะกอน PHB ปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และล้างด้วย Absolute ethanol 1-2 ครั้ง
6. นำ PHB ไปตากแห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนัก บันทึกผล



รูปที่ 2.8 แผนผังขั้นตอนการสกัด PHB จากเซลล์แห้ง



รูปที่ 2.9 การแยกบริสุทธิ์ PHB จากเซลล์จุลินทรีย์

2.2.11 การศึกษา PHB ที่สะสมภายในเซลล์

A) การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสง (Light microscopy observation) (Byrom et al.1995) เชื้อจุลินทรีย์ก่อนจะนำมาศึกษา ต้องเป็นเชื้อที่มีอายุ 48-68 ชั่วโมง

วิธีย้อมสี PHB (PHB strain)

1. เผา loop ให้ร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเขี่ยเชื้อ *B. megaterium* จากหลอดเลี้ยงเชื้อ (Agar slant) ด้วยวิธี Aseptic technique
2. เกลี่ยเชื้อจุลินทรีย์ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ประมาณ 10 x 30 ตารางมิลลิเมตร
3. ตรึงรอยเกลี่ยเชื้อโดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง (ทำให้ Cytoplasm ตกตะกอน และเซลล์ติดที่แผ่นสไลด์)
4. หยดสี Sudan ลงบนรอยเกลี่ยเชื้อ
5. ทิ้งไว้ประมาณ 5 – 10 นาที (ระหว่างรอ 70% Ethanol ซึ่งเป็นส่วนผสมของSudan อาจจะระเหยได้ ดั้งนั้นสามารถจะหยดสี Sudan ลงไปเพิ่มได้)
6. ล้างสี Sudan ออกด้วย Xylene ประมาณ 10 วินาที (สามารถทิ้งไว้ให้แห้งได้)
7. ย้อมสีฉากหลัง (Counterstrain) ด้วยสารละลาย Safranine
8. ทิ้งไว้ประมาณ 10 วินาที แล้วล้างสีออกด้วยน้ำ
9. นำไปส่งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า (ใช้ oil immersion หยดก่อนเปลี่ยนเป็นกำลังขยายสูงสุด) ซึ่งถ้าใช้สี Sudan Black B จะเห็น PHB granule สีดำ แต่ถ้าใช้สี Sudan จะเห็น PHB granule สีแดงส้ม และบันทึกภาพ

<u>หมายเหตุ</u> Xylene (dimethylbenzene) เป็นสารระเหยที่มีพิษ ดังนั้นควรใช้อย่างระมัดระวัง และควรมีผ้าปิดจมูก ใส่ถุงมือกันสารพิษทุกครั้ง

B) การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron microscopy observation) เชื้อจุลินทรีย์ก่อนจะนำมาศึกษา ต้องเป็นเชื้อที่มีอายุ 48 ชั่วโมง

วิธีเตรียมตัวอย่างสำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Mona et al., 2001)

(Prepare of Specimens in the Transmission Electron microscopy)

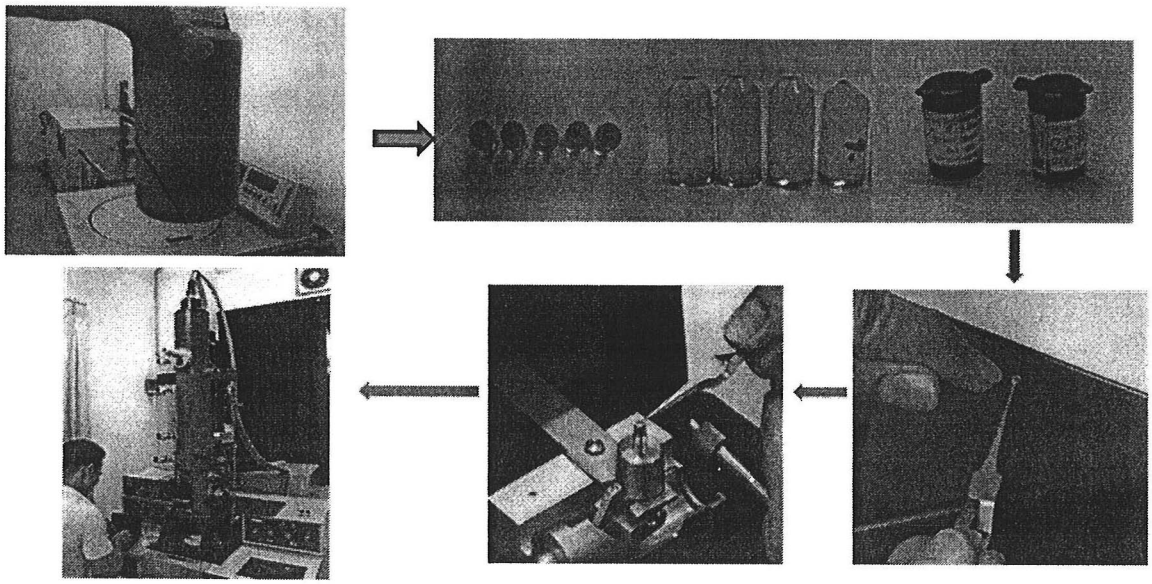
1. นำเซลล์จุลินทรีย์ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์
2. นำเซลล์ที่ได้ไปตรึงครั้งแรก (Primary fixation) ด้วยสารละลาย 2.5 % Glutaraldehyde โดยใส่ 2.5% Glutaraldehyde ลงไปให้ท่วมตัวอย่าง ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดเอาสารละลาย 2.5% Glutaraldehyde ออกให้หมด
3. ใส่สารละลาย PBS buffer ลงไปให้ท่วมตัวอย่าง ทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นดูดสารละลาย PBS buffer ออกจากตัวอย่าง (ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง)
4. ทำการตรึงเซลล์ตัวอย่างครั้งที่ 2 (Secondary Fixative) ด้วย OsO_4 โดยใส่สารให้ท่วมตัวอย่าง แช่ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง จากนั้นดูดสาร OsO_4 ออกให้หมด
5. ทำการ Dehydration ด้วย Acetone ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

เริ่ม Dehydration ด้วย Acetone ที่ความเข้มข้น 30 % โดยดูด 30% Acetone ใส่ให้ท่วมตัวอย่างทั้ง 2 ตัวอย่าง ทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นดูด 30% Acetone ออกให้หมด แล้วใส่ Acetone ที่ความเข้มข้นใหม่เข้าไปแทนดังนี้คือ ที่ความเข้มข้น 50%, 70%, 90% และ 100% ตามลำดับ แช่ตัวอย่างทิ้งไว้ความเข้มข้นละ 15 นาที ทำจนครบ (ยกเว้นที่ความเข้มข้น 100% Acetone ให้ทำการ Dehydration 2 ครั้ง)

6. ในระหว่างที่ Dehydration เตรียม resin เพื่อนำไปทำ Embedding โดยผสม ARAL 6.75 ml ,DDSA 5.75 ml และDMP 0.08 ml คนให้เข้ากันโดยไม่ให้เกิดฟอง
7. นำ resin ได้ผสมกับ Absolute ethanol ด้วยอัตราส่วน 1:2 แล้วส่วนผสมที่ได้ เทลงในหลอดที่บรรจุตัวอย่างที่ Dehydration เรียบร้อยแล้ว ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เมื่อครบชั่วโมงทำแบบเดิมซ้ำแต่เปลี่ยนอัตราส่วนเป็น 1:1 ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง (เพื่อให้ resin ซึมเข้าไปในตัวอย่าง)
8. นำตัวอย่างที่แช่ในอัตราส่วน 1:1 มาแช่ใน pure resin ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (เพื่อให้ resin ซึมเข้าไปในตัวอย่าง)
9. นำตัวอย่างที่แช่ใน pure resin จากข้อที่ 8 ใส่ลงบริเวณปลายบล็อกของ resin แล้วจึงเท pure resin ทับตัวอย่างลงไปในบล็อก (Embedding)
10. นำ resin ที่มีตัวอย่างอยู่ภายในบล็อก บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เพื่อให้ resin แข็งตัว
11. นำ resin ตัด section (Ultra thin section) บางขนาด 70 นาโนเมตร แล้วนำตัวอย่างวางไว้บนกริด (แผ่นทองแดงสำหรับตัวอย่างก่อนส่องกล้อง)

12. นำกริดที่มีตัวอย่างไปย้อมด้วย Uranyl acetate 30 นาที แล้วจึงนำไปส่องด้วย กล้องจุลทรรศอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Zeiss CEM 902 Transmission Electron Microscope) และบันทึกภาพ (รูปที่ 2.10)

*หมายเหตุ OsO_4 เป็นสารก่อมะเร็ง ควรใช้อย่างระมัดระวัง ใส่ถุงมือทุกครั้ง และถ้าจะนำ OsO_4 ทิ้ง ควรทิ้งในน้ำนมเพื่อลดความเป็นพิษ



รูปที่ 2.10 ขั้นตอนการเตรียมชิ้นงานสำหรับ TEM

2.2.12 การวิเคราะห์ PHB (PHB Analysis)

วิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลด้วย Nuclear magnetic resonance (NMR)

นำ PHB ที่สกัดได้ วิเคราะห์ NMR ณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ซึ่งวิเคราะห์แบบ ^{1}H และ ^{13}C โดยใช้ตัวทำละลาย $CDCl_2$ เพื่อทดสอบว่าสารที่สกัดได้คือ PHB จริง โดยเปรียบเทียบพีค ^{1}H และ ^{13}C NMR ของ PHB ที่ได้ กับพีค ^{1}H และ ^{13}C NMR ของ PHB จากงานวิจัยอ้างอิง

การทดสอบคุณสมบัติทนความร้อน (thermal property)

นำ PHB ที่สกัดได้วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) ณ ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (MTEC) เพื่อทดสอบคุณสมบัติทนต่อความร้อนโดยดูจากค่า glass transition temperature (T_g), melting temperature (T_m), และ heating crystallization temperature (T_{hc}) ร่วมกับ cooling crystallization temperature (T_{cc}) เพื่อใช้ในการคำนวณหาค่า degree of crystallinity (X_c) ซึ่งเป็นค่าสัดส่วนระหว่างอัตราของ melting enthalpy ของสารตัวอย่าง (ΔH_m) และ

melting enthalpy ของ pure crystalline PHB (ΔH_m^0 = 146 J/g) (Jianchun et al., 2003; Gogolewski et al., 1993)

วิเคราะห์มวลโมเลกุลด้วย Gel permeation chromatography (GPC)

นำสารสกัด PHB วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล GPC (Waters 410E) ณ สาขาวิศวกรรมพอลิเมอร์ สำนักวิชาวิศวกรรมพอลิเมอร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ใช้ Tetrahydrofuran (THF) และ Chloroform HPLC grade เป็น mobile phase การหามวลโมเลกุลของ PHB นั้นจะเปรียบเทียบกับ Polystyrene standard ที่ทราบมวลโมเลกุลแน่นอน

การทดสอบคุณสมบัติเชิงกล (mechanical property)

โดยนำสาร PHB ที่สกัดได้ ไปขึ้นรูปด้วยเครื่องอัดความร้อน เพื่อทดสอบสมบัติเชิงกล เช่น สมบัติการยืดตัวออก และการทนต่อแรงดึง