บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. ถังหมักขนาด 5 ลิตรและชุดควบคุมถังหมัก รุ่น EPC-1000 ของบริษัท EYELA, Japan
2. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaker) รุ่น Innova 4330 ของบริษัท New Brunwick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA และรุ่น Gyromax 707R ของบริษัท Amerex Instruments, Inc., USA
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920, รุ่น 6500 ของบริษัท Kubota, Japan และรุ่น Avanti J-30I ของบริษัท Beckman Coulter, Germany
4. เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น PG 2002-S และรุ่น PG 6002-S ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
5. เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น AG 204 และรุ่น AG 285 ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Spectronic Unicam, USA, รุ่น Gensys 20 ของบริษัท Thermo Spectronic, USA และรุ่น Perkin Elmer instruments Lamda 25 UV/VIS Spectrometer ของบริษัท PerkinElmer, Inc., USA
7. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอน (Total organic carbon analyzer) รุ่น TOC V-csh ของบริษัท Shimadzu
8. เครื่อง Gel Permeation Chromatography (GPC) รุ่น CLASS-VP V6.14 ของบริษัท Shimadzu
9. เครื่องวิเคราะห์ Nuclear magnetic resonance analyzer ของบริษัท Varian Inova, USA
10. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA
11. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CH30RF200 ของบริษัท Olympus, Japan
12. กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ ของบริษัท Olympus, Japan

13. ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow ISSCO รุ่น BV-124 ของบริษัท International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand, รุ่น Clear รุ่น V3-4 ของบริษัท Triwork 2000 Co., Ltd., Thailand และ Bosstech รุ่น HVB 120S ของบริษัท Boss Scientific Associate L.P., Thailand
14. ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
15. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Seiko Ltd., Japan รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท Hirayama Co., Ltd., Japan
16. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น SevenEasy ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
17. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น INE 500 ของบริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
18. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 ของบริษัท PMC, USA
19. เครื่องให้ความร้อน (stirring hot plate) รุ่น DS 201HS ของบริษัท DMC, Japan
20. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB14 และรุ่น W760 ของบริษัท Memmert, Germany
21. เครื่องก๊าซโครมาโตรกราฟี (Gas Chromatography) รุ่น 3400C ของบริษัท Varian, USA
22. แคปพิลลารีคอลัมน์ (capillary column) ชนิด cabowax-PEG ขนาด 60 m×25 mm ID× 25 μm Df
23. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ของบริษัท Forma Scienctific, USA และ Sanyo Electric, Japan
24. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo Electric, Japan
25. ตู้เย็น (freezer) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท Mitsubishi Electric, Japan
26. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) รุ่น P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France
27. ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane) ขนาด 0.45 μm ของบริษัท Sartorius, Germany
28. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และ 2 ของบริษัท Whatman International Ltd., England
29. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) จัดจำหน่ายโดยบริษัท Bioadvance, Thailand
30. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX

31. หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท PYREX
32. กระบอกตวง (Cylinder) ของบริษัท PYREX
33. บีกเกอร์ (Beaker) ของบริษัท PYREX
34. หลอดทดลองฝาเกลียว (screw-cap tube) ของบริษัท PYREX
35. กระบอกเซ็นตริฟิวจ์ (centrifuge ware) ของบริษัท Nalgene

3.2 เคมีภัณฑ์

1. ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ของบริษัท Witcorp Co.Ltd., Thailand
2. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4) ของบริษัท Merck, Germany
3. กรดเบนโซอิก ($C_7H_6O_2$) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan
4. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท Merck, Germany
5. กลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$) ของบริษัท Merck, Germany
6. คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) ของบริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Ireland
7. คอปเปอร์ไดคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Farmitalia Carlo Erba S.p.A, Italy
8. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ของบริษัท Farmitalia Carlo Erba S.p.A, Italy
9. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Farmitalia Carlo Erba S.p.A, Italy
10. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
11. โซเดียมซิเตรท ($C_6H_5Na_3O_7$) ของบริษัท Merck, Germany
12. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
13. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ของบริษัท Merck, Germany
14. ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท Merck, Germany
15. ทริปโตส (tryptose) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
16. เปบโตน (peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
17. โพแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท Merck, Germany
18. โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Merck, Germany
19. เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany
20. เมทานอล (CH_3OH) ของบริษัท Merck, Germany
21. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_20$) ของบริษัท Merck, Germany

22. แมงกานีสไดคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany
23. วุ้นผง (agar) ของบริษัท บิกเบน โปรดัคตอรา เดอ อะการ์ เอส.เอ., Chile
24. สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) ของบริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Ireland
25. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Springer, France
26. อะซีโตน (C_3H_6O) ของบริษัท Merck, Germany
27. เอทานอล (C_2H_5OH) ของบริษัท Merck, Germany
28. แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] ของบริษัท Merck, Germany
29. เฮกเซน (C_6H_{14}) ของบริษัท Merck, Germany
30. Sudan Black B ของบริษัท Merck, Germany
31. Nystatin ($C_{47}H_{75}NO_{17}$) ของบริษัท MP Biomedicals, France
32. Nile Blue A ของบริษัท Sigma, USA
33. กรดออกตะโนอิก ($C_8H_{16}O_2$) ของบริษัท Merck, Germany
34. กรดเดคะโนอิก ($C_{10}H_{20}O_2$) ของบริษัท Merck, Germany
35. ก๊าซไฮโดรเจน (H_2) ของบริษัท PRAXAIR, Thailand
36. ก๊าซออกซิเจน (O_2) ของบริษัท TIG (Thai Industrial Gas), Thailand
37. ก๊าซไนโตรเจน (N_2) ของบริษัท PRAXAIR, Thailand

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

หมายเหตุ: สารเคมีที่ใช้ทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)

3.3. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยคือ *Acinetobacter* sp. ASC1, *Pseudomonas* sp. ASC2, *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกโดย อัมทิกา เมืองวงษ์ มีความสามารถในการสร้างและสะสมพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (PHA) ซึ่งคัดแยกมาจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันพืชที่ใช้แล้วในจังหวัดสุพรรณบุรี

3.4 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

3.4.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะสั้น

เขี่ยจุลินทรีย์โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อลาก (streak) บนอาหารแข็งเอียง LB (ภาคผนวก ก 1) เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ และถ่ายลงในอาหารใหม่ทุกๆ 1 เดือน

3.4.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะยาว

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (ภาคผนวก ก2) นำไปเลี้ยงในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเหลวที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข4) จากนั้นปั่นแยกเซลล์และทำซ้ำอีกรอบ กระจายเซลล์ในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข1) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และปรับให้อยู่ในช่วง 0.8-1.0 (จำนวน 10^9 CFUต่อมิลลิลิตร) บรรจุลงในหลอดเยือกแข็ง (cryotube) ที่ปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน หรือเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี

3.5 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs โดยใช้ของเสียจากการผลิตไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชใช้แล้ว

3.5.1 การเก็บตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณที่ปนเปื้อนน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว บันทึกวันและเวลาที่เก็บนำตัวอย่ามาแยกเชื้อทันที หรือเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าดำเนินการแยกเชื้อ

3.5.2 การเก็บตัวอย่างของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

เก็บตัวอย่างของเสียอินทรีย์จากโรงงานผลิตไบโอดีเซลซึ่งผลิตมาจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้วของบริษัท วิทย์คอร์ป จำกัด มหาชน ตั้งอยู่เลขที่ 52/4 หมู่ 6 ซอยสุชัย ถนนพระราม 2 ตำบลท่าทราย อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้ในการเตรียมอาหารสังเคราะห์สำหรับคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย และเป็นแหล่งคาร์บอนให้แบคทีเรียในการผลิต PHA ต่อไป

3.5.3 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต PHAs โดยใช้ของเสียที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

นำตัวอย่างดิน 10 กรัม เติมลงในอาหารสังเคราะห์ (Chanprateep และคณะ, 2008) โดยมีของเสียอินทรีย์ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับค่าความเป็นกรด ด่าง เท่ากับ 7 ซึ่งบรรจุปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยเติม Nystatin ซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (ภาคผนวก ข7) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งอาหารเริ่มขุ่น ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารสังเคราะห์สูตรเดิมทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นกระจายเชื้อบนอาหารแข็งสูตรเดียวกัน แยกโคโลนีเดี่ยวและทำให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ นำเชื้อที่บริสุทธิ์มาย้อมด้วย Sudan Black B และ Nile Blue A ตามวิธีข้อ 3.5.4 เพื่อตรวจสอบเบื้องต้นว่าแบคทีเรียนั้นสามารถผลิต PHAs ได้หรือไม่ จากการย้อมแกรนูล PHAs แบคทีเรียที่มีแกรนูล PHAs จะถูกนำมาศึกษาต่อไป และเก็บรักษาแบคทีเรียโดยการเตรียมหัวเชื้อใน 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อทำเป็นหัวเชื้อตามข้อ 3.4.1 และ 3.4.2

3.5.4 การย้อมแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ด้วย Sudan Black B และ Nile Blue A ตามวิธีของ Jenkins และคณะ (1993) และ Song และคณะ (2008) ตามลำดับ

นำแบคทีเรียที่บริสุทธิ์แล้วมากระจายตัวบนสไลด์ ย้อมด้วย Sudan Black B (ภาคผนวก ข4) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น ย้อมด้วย Safranin เป็นเวลา 5-10

วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้ามี PHAs ซึ่งสะสมอยู่ในรูปของแกรนูล แกรนูลจะติดสีเทาดำและอยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย

การย้อมด้วย Nile blue A นำแบคทีเรียที่บริสุทธิ์แล้วมากระจายตัวบนสไลด์ ย้อมด้วย Nile blue A (ภาคผนวก ข5) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ นำไปตรวจสอบแกรนูลภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ถ้ามี PHAs ซึ่งสะสมในรูปของแกรนูลภายในเซลล์จุลินทรีย์ แกรนูลจะมีสีแดงหรือสีส้ม

3.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทางอนุกรมวิธาน

3.6.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5.3 บนอาหารแข็งสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิต PHA (ภาคผนวก ก3) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีและการเจริญบนอาหาร ศึกษารูปร่างและลักษณะการย้อมติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.6.2 การศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา หรือการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น (Physiological characteristic and Biochemical test)

แปรผลการทดสอบต่างๆ โดยการอ้างอิงกับคู่มือการจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรีย Bergey's Mannual of Determinative Bacteriology (Buchanan และ Gibbons, 1974)

เตรียมแบคทีเรียที่มีอายุ 24 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงบนอาหารต่างๆ และทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ ศึกษาการเจริญบนอาหารแข็ง McConky ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน ความสามารถในการหมักน้ำตาล ความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test) ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test) ความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test) ความสามารถในการผลิต Indole (Indole test) การทดสอบ Methyl Red-Vogesprokauer tests (MR-VP test) การทดสอบการใช้ซิเตรต (citrate utilization test) การทดสอบ Triple Sugar Iron (TSI) reaction ความสามารถในการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S)

ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Lysine decarboxylase Lysine deaminase และ Ornithine decarboxylase และทดสอบความสามารถในการผลิตยูรีเอส (Urease test)

3.6.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal RNA (16S rRNA)

นำจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้ของเสียอินทรีย์ที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซล และสะสมแกรนูล PHA ภายในเซลล์จากข้อ 3.5.4 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA โดยนำแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่เก็บในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี โดยใช้ไพร์เมอร์คือ 518F และ 800R เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอแล้ว เชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNASIS-Mac Software Version 2.05 (Hitachi Software Engineering Co.Ltd., Yokohama, Japan) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.6.4 ต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

นำลำดับนิวคลีโอด์ของ 16S rRNA ที่ผ่านการวิเคราะห์แล้ว และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ ทำการปรับแนวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal X จากนั้นนำข้อมูลที่ผ่านการปรับแนว มาคำนวณ distance matrix สร้าง phylogenetic tree ด้วยการวิเคราะห์แบบ Neighbor-joining และ Bootstrap ด้วยโปรแกรม PHYLIP software package version 3.752c ซึ่งประกอบด้วย PRODIST.EXE NEIGHBOR.EXE SEQBOOT.EXE และ CONSENSE.EXE ตามลำดับ ต้นไม้วิวัฒนาการที่ถูกสร้างขึ้น นำเสนอโดยใช้โปรแกรม TREEVIEW (Kimura,1980)

3.7 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs จากของเสียที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลในระดับขวดเขย่า

3.7.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมกล้าเชื้อโดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเตรียมกล้าเชื้อ (Chanprateep และคณะ, 2008) โดยใช้อาหารเตรียมกล้าเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาดปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อที่เก็บรักษาในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ (จำนวน 10^9 CFUต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อ 1 ฟลาสก์ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บตะกอนเซลล์มาล้างด้วยสารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ที่ปราศจากเชื้อ ทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง จากนั้นกระจายเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเพื่อเตรียมสำหรับการเลี้ยงในระดับขวดเขย่า

3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนทั้งหมดในของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

นำของเสียอินทรีย์ที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลประมาณ 10 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Total organic carbon analyzer (TOC analyzer) ที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7.3 การผลิตในระดับขวดเขย่า

3.7.3.1 ศึกษาหาปริมาณของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต PHAs ของแบคทีเรียในระดับขวดเขย่าตามวิธีของ Chanprateep และคณะ (2008)

นำกล้าเชื้อจากข้อ 3.7.1 ถ่ายลงสู่อาหารเพื่อการผลิตปริมาตร 150 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด ด่างเท่ากับ 7 บรรจุในฟลาสก์ขนาดปริมาตร 500 มิลลิลิตร แปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนคือ ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่เติมลงใน

อาหารเพื่อการผลิตดังนี้ 5 10 และ 20 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต โดยแปรผันอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนดังนี้ 4 20 80 และ 200 ทั้งนี้ต้องวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนทั้งหมดในของเสียอินทรีย์ (Total Organic Carbon; TOC) เพื่อใช้คำนวณอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน เลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งตามข้อ 3.7.3.3 ปริมาณไนโตรเจนตามข้อ 3.7.3.5 ปริมาณของคาร์บอนในของเสียอินทรีย์ที่เหลืออยู่ตามข้อ 3.7.3.4 และองค์ประกอบของ PHAs ตามขั้นตอนในข้อ 3.8.1 ต่อไป

3.7.3.2 ศึกษาการผลิต PHAs ในระดับขวดเขย่าโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนของเสียอินทรีย์ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

นำกล้าเชื้อจากข้อ 3.7.1 ถ่ายลงอาหารเพื่อการผลิตปริมาตร 150 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด ด่างเท่ากับ 7 บรรจุใน ฟลาสก์ขนาดปริมาตร 500 มิลลิลิตร แหล่งคาร์บอนคือ น้ำตาลกลูโคสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 200 เลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งตามข้อ 3.7.3.3 ปริมาณไนโตรเจนตามข้อ 3.7.3.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามข้อ 3.7.3.6 และองค์ประกอบของ PHAs ตามขั้นตอนในข้อ 3.8.1 ต่อไป

3.7.3.2 วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

อบเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสขนาด 0.45 ไมโครเมตร จนได้น้ำหนักคงที่ กรองน้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปอบที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บไว้ในเดซิเคเตอร์จนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งในหน่วยกรัมต่อลิตร

3.7.3.3 วิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนที่เหลือทั้งหมดในของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง TOC analyzer ที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7.3.4 วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนตามวิธีของ Kempers (1974)

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำน้ำหมักที่เจือจางแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมโปแตสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมฟีนอลไนโตรพัสไซดีรีเอเจนท์ 2 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรด์รีเอเจนต์ 4 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดประจุ 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจน และค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร คำนวณปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.7.4 การผลิตในระดับถังหมัก

นำภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ คือมีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 เลี้ยงในถังหมัก EYELA รุ่น EPC-1000 ขนาด 5 ลิตร เลี้ยงเชื้อแบบแบบแบตช์ (batch) เตรียมกล้าเชื้อตามข้อ 3.7.1 ถ่ายลงสู่อาหารเพื่อการผลิตปริมาตร 2.5 ลิตร อัตราเร็วในการกวน 600 รอบต่อนาที มีอัตราการให้อากาศ 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที ค่าความเป็นกรด ด่าง เริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

3.8 ศึกษาการผลิต PHAs โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนของเสียอินทรีย์ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

3.8.1 ศึกษาการผลิต PHAs ในระดับขวดเขย่าโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนของเสียอินทรีย์ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

นำกล้าเชื้อจากข้อ 3.7.1 ถ่ายลงอาหารเพื่อการผลิตปริมาตร 150 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด ด่างเท่ากับ 7 บรรจุในฟลาสก์ขนาดปริมาตร 500 มิลลิลิตร แหล่งคาร์บอนคือน้ำตาลกลูโคสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต อัตราส่วนคาร์บอน

ต่อไนโตรเจน 200 เลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งตามข้อ 3.7.3.2 ปริมาณไนโตรเจนตามข้อ 3.7.3.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามข้อ 3.8.2 และองค์ประกอบของ PHAs ตามขั้นตอนในข้อ 3.9.1 ต่อไป

3.8.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Bernfeld (1995)

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสม เพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรอยู่ในช่วง 0.2 ถึง 0.8 จากนั้นใช้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid หรือ DNSA reagent, ภาคผนวก ข13) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค1) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.9 วิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของ PHAs ที่ผลิตได้

3.9.1 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์โดยวิธีก๊าซโครมาโตรกราฟี (Gas chromatography: GC) ตามวิธีของ Comeau และคณะ (1988)

แยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก โดยการปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปอบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 20 มิลลิกรัม ใส่เซลล์แห้งที่ชั่งแล้วลงในหลอดฝาเกลียว เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย 3 เปอร์เซ็นต์ กรดซัลฟูริกในเมทานอล 2 มิลลิลิตร ที่มีกรดเบนโซอิก 2 กรัมต่อลิตรเป็นสารมาตรฐานภายใน ปิดฝาเกลียวให้แน่น นำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เขย่าด้วยเครื่องเขย่าอย่างรุนแรงทุก 30 นาที เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด ทิ้งให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเขย่าผสมให้เข้ากันนาน 5 นาที ทิ้งให้สารละลายแยกเป็น 2 ชั้น เลือกเก็บชั้นล่างซึ่งเป็นชั้นของคลอโรฟอร์มและเก็บในขวดฝาเกลียวขนาดเล็ก ปิดฝาให้แน่น วิเคราะห์ปริมาณ PHA โดยวิธีแก๊สโครมาโตรกราฟีโดยใช้ภาวะการวิเคราะห์และการคำนวณตามวิธีของสุชาดา จันทร์ประทีป (2539) ภายใต้ภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์	: แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด cabowax-PEG
	ขนาด 60 m×25 mm ID× 25 μm Df
อุณหภูมิของ injector	: 250 องศาเซลเซียส (isothermal)
อุณหภูมิของ column	: 130 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น
	180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที
	รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 180 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ detector (FID)	: 250 องศาเซลเซียส (isothermal)
split ratio	: 50 ต่อ 1
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	: He อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรฉีด	: 1 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์ชนิดของโมโนเมอร์ โดยการเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของสารตัวอย่างกับเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารมาตรฐาน

การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ของ PHA (กรัมต่อลิตร) คำนวณปริมาณโมโนเมอร์ (ที่มีสารมาตรฐานภายในเป็นกรดเบนโซอิก 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่วิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน (ภาคผนวก ค2 และ ค3)

3.9.2 การสกัด PHA จากเซลล์แห้งและการทำให้บริสุทธิ์

ใช้วิธีของ Doi และคณะ (1995) โดยปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์ทั้งหมดไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะแห้ง จากนั้นบรรจุเซลล์แห้งลงในถุงกระดาษกรอง whatman เบอร์ 2 เย็บปิดด้วยด้ายทุกด้านให้สนิท นำไปใส่ขวดที่มีฝาปิดสนิท และสกัดพอลิเมอร์ด้วยคลอโรฟอร์มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเทใส่ภาชนะตั้งทิ้งไว้ที่ตู้ระเหยสารเคมีที่อุณหภูมิห้อง เพื่อระเหยคลอโรฟอร์มออกให้หมด จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์ม นำมาทำให้บริสุทธิ์อีกรอบ โดยละลายแผ่นฟิล์มที่ได้ในคลอโรฟอร์มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนเป็นเนื้อเดียวกันอีกครั้ง นำมาตกตะกอนในเฮกเซน ปริมาตร 4 เท่า ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บพอลิเมอร์ที่ตกตะกอนในเฮกเซนซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นผงสีขาวไว้ในเดซิเคเตอร์

3.9.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิเมอร์ด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

นำพอลิเมอร์ที่บริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 3.9.2 มาละลายด้วย $CDCl_3$ วิเคราะห์โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (^{1}H-NMR) และคาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (^{13}C-NMR) spectra ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโคปี (Fourier transform nuclear magnetic resonance spectrometer) ความถี่ 500 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วิเคราะห์ Two dimension-^{1}H-correlation spectroscopy (2D-^{1}H - COSY) ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโคปี ความถี่ 400 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.10 ทดสอบสมบัติทางกายภาพของ PHAs

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารผลิตภัณฑ์ตามวิธีของ Abate และคณะ (1995)

ละลายพอลิเมอร์ในคลอโรฟอร์มชนิดเกรด HPLC เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ กรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน นำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography รุ่น Shimadzu CLASS-VP V6.14 ที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้คอลัมน์ Water Styragel HT 6E มีตัวพาเป็นคลอโรฟอร์ม อัตราการชะที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส คำนวณน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของพอลิสไตรีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 96,400 ถึง 456 ดาลตัน (Da) ซึ่งวิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน