บทที่ 4

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

4.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

4.1.1 กระบวนการหมัก (Fermentation)

ถังหมัก (Fermenter) รุ่น Biostat® ED, ระบบวัดและควบคุม DCU-system รุ่น 2.30 ของบริษัท B.Braun biotech international, Germany

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) ของบริษัท Gasells chaft fur Labortechnik, Germany

ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Oven) รุ่น ULM 500 ของบริษัท Memmert GmbH+Co.KG, Germany

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Kubota 5100 ของบริษัท Kubota corporation, Japan

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Kubota 7820 ของบริษัท Kubota corporation, Japan

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Spectronic Instruments, USA

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HL24ADY ของบริษัท Hirayama Manufacturing corporation, Tokyo, Japan

อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น Julabo HC-2/8 ของบริษัท Labartechnik GMBH, Germany

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น MP220 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (4-digits balance) รุ่น AB204 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland

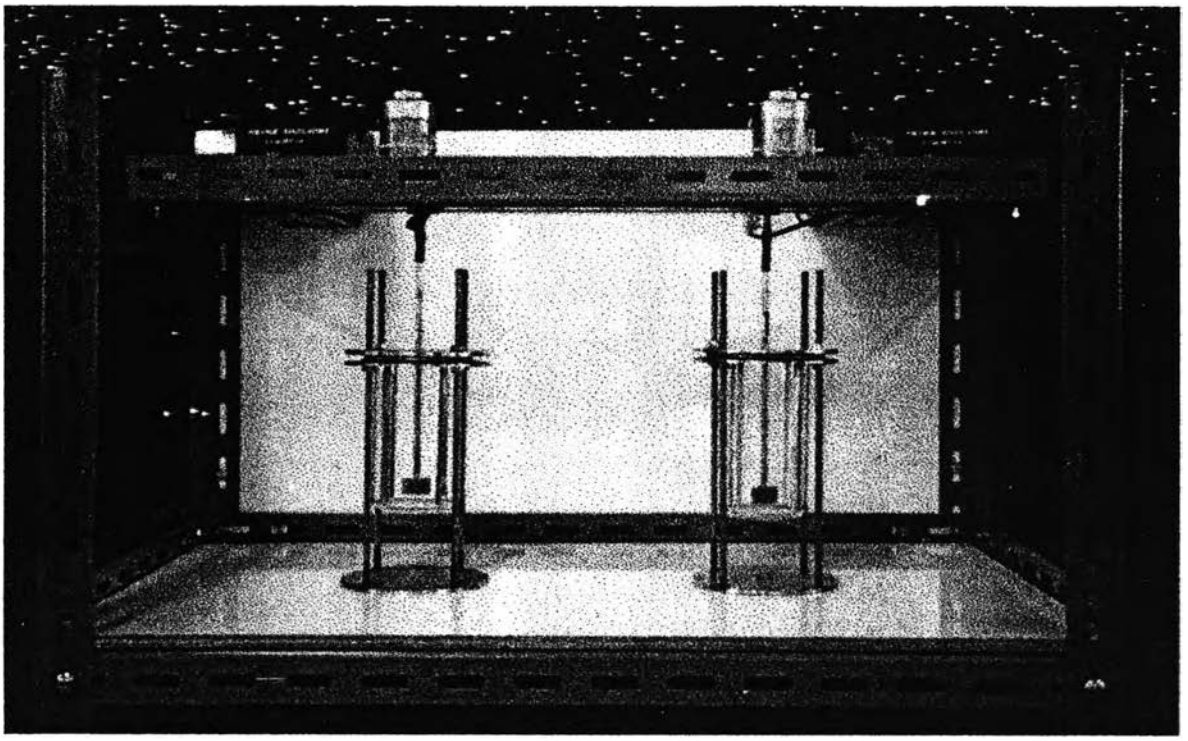
ปั๊มลม (Air compressor) รุ่น Bebicon ของบริษัท Hitachi Ltd,, Japan

ตู้ถ่ายเชื้อแบบ (Laminar flow) รุ่น VS-124 ของบริษัท Issco, USA

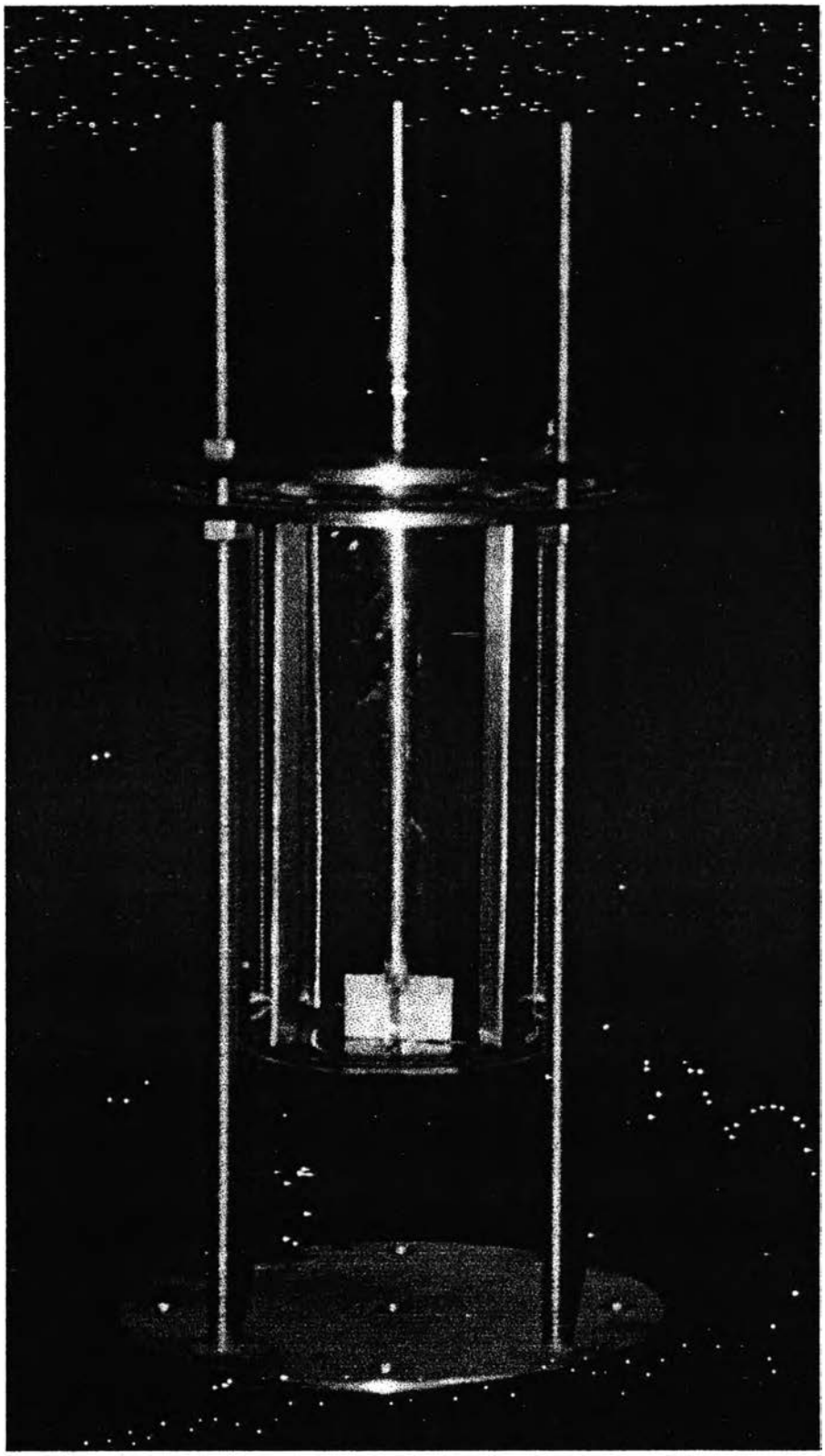
4.1.2 กระบวนการสกัด (Extraction)

ชุดเครื่องมือที่ใช้ในการสกัด ดังแสดงในรูปที่ 4.1 ประกอบด้วย

- ถังกวนแบบแก้ว (glass reactor) ขนาดตามมาตรฐาน มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 65 มิลลิเมตร ติด baffles 4 ใบขนาดความกว้าง 5.42 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.2
- มอเตอร์กระแสตรงขนาด 24 โวลท์ (DC motor)
- เครื่องปรับระดับแรงดันไฟฟ้า 1.5 ถึง 30 โวลท์ (Voltage regulator)
- ขาตั้งปรับระดับได้สำหรับถังกวนแบบแก้ว
- ใบกวนขนาดตามมาตรฐาน มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 21.67 มิลลิเมตร กว้าง 4.33 มิลลิเมตร



รูปที่ 4.1 **แสดงชุดอุปกรณ์ที่ใช้ทดลองในกระบวนการสกัด**



รูปที่ 4.2 แสดงชุดถังกวนแบบแก้วพร้อมใบกวน และชุดขาตั้ง

โฮโมจิไนเซอร์ (Homogenizer) รุ่น Ultra-turrax T25 ของบริษัท Ika®,Germany

เครื่องกวนสารละลาย (Mixer stirrer) รุ่น RW 20 DZM ของบริษัท Ika®,Germany

เครื่องกำเนิดคลื่นเหนือเสียง (Ultrasonic) รุ่น VC50 ของบริษัท Sonics&Materials Inc., USA ประกอบด้วย

- อุปกรณ์กำเนิดคลื่นเหนือเสียงความถี่ 20 kHz ที่กำลัง 25 และ 50 วัตต์
- หัวจุ่มคลื่นเหนือเสียง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.64 มิลลิเมตร

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy) รุ่น JNM-A500 ของบริษัท JEOL, Japan

เจลเพอมิเอชันโครมาโทกราฟี (Gel permeation chromatography) รุ่น Waters150-CV ของบริษัท Millipore, USA

ดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งคาลอริมิเตอร์ (Differential scanning calorimeter) รุ่น DSC 7 ของบริษัท Perkin elmer, USA

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) รุ่น JSMของบริษัท JEOL, Japan

4.2 สารเคมี

กลูโคส [glucose] ของบริษัท Ajax Chemical, Australia

แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] ของบริษัท Ajax Chemical, Australia

แอมโมเนียมโมลิบเดต [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$] ของบริษัท Ajax Chemical, Australia

แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ [$(NH_4)OH$] ของบริษัท Carlo Erba, Italy

โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต [KH_2PO_4] ของบริษัท Ajax Chemical, Australia

I 19235046

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต [$Na_2HPO_4.12H_2O$] ของบริษัท Ajax Chemical, Australia

แมกนีเซียมซัลเฟต [$MgSO_4.7H_2O$] ของบริษัท Ajax Chemical, Australia

เฟอรัสซัลเฟต [$FeSO_4.7H_2O$] ของบริษัท Ajax Chemical, Australia

ซิงค์ซัลเฟต [$ZnSO_4.7H_2O$] ของบริษัท Ajax Chemical, Australia

คอปเปอร์ซัลเฟต [$CuSO_4.5H_2O$] ของบริษัท Carlo Erba, Italy

แมงกานีสซัลเฟต [$MnSO_4.5H_2O$] ของบริษัท Ajax Chemical, Australia

แคลเซียมคลอไรด์ [$CaCl_2.H_2O$] ของบริษัท Merck, Germany

โซเดียมเตตราบอเรต [$Na_2B_4O_7.7H_2O$] ของบริษัท Ajax Chemical, Australia

โซเดียมไดโตรพรัสไซด์ [Sodium nitroprusside] ของบริษัท Fluka, Switzerland

โซเดียมไฮดรอกไซด์ [NaOH] ของบริษัท Merck, Germany

โซเดียมไฮโปคลอไรต์ [NaOCl] Ajax Chemical, Australia

โซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตรท [$KNaC_4H_4O_6.4H_2O$] ของบริษัท Ajax Chemical, Australia

กรดไฮโดรคลอริค [HCl] ของบริษัท BDH Laboratory, England

กรดซัลฟุริก [H_2SO_4] ของบริษัท Merck, Germany

กรดซิตริก [Citric acid] ของบริษัท Carlo Erba, Italy

กรดไดไนโตรซาลิไซลิก [$C_7H_4N_2O_7$] ของบริษัท Fluka, Switzerland

ฟีนอล [Phenol] ของบริษัท Carlo Erba, Italy

อะซิโตน [$(CH_3)_2CO$] ของบริษัท Ajax Chemical, Australia

เอทานอล 99.8% [C_2H_6O] ของบริษัท Carlo Erba, Italy

คลอโรฟอร์ม [$CHCl_3$] ของบริษัท Ajax Chemical, Australia

เฮกเซน [$CH_3(CH_2)_4CH_3$] ของบริษัท Mallinckrodt, USA

4.3 เชื้อจุลินทรีย์

ในการทดลองใช้เชื้อ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 สั่งซื้อจาก National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria ประเทศสก็อตแลนด์

4.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

4.4.1 อาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ ใช้อาหารอุดมแบบแข็งเอียง (nutrient agar slant)

4.4.2 อาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ ใช้อาหารอุดมแบบเหลว (nutrient broth)

4.4.3 อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในขวดแก้วทรงกรวย

ใช้อาหารสูตรเกลือแร่ (mineral salts medium) ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

กลูโคส [glucose]	10	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต [$MgSO_4.7H_2O$]	0.2	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]	1	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต [KH_2PO_4]	1.5	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต [$Na_2HPO_4.12H_2O$]	9	กรัม
สารละลายธาตุเสริม (trace element)	1	มิลลิลิตร

ซึ่งสารละลายธาตุเสริม (trace element) ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

- เฟอรัสซัลเฟต [$FeSO_4.7H_2O$]	10	กรัม
- ซิงค์ซัลเฟต [$ZnSO_4.7H_2O$]	2.25	กรัม
- คอปเปอร์ซัลเฟต [$CuSO_4.5H_2O$]	1	กรัม
- แมงกานีสซัลเฟต [$MnSO_4.5H_2O$]	0.5	กรัม
- แคลเซียมคลอไรด์ [$CaCl_2.H_2O$]	2	กรัม

- โซเดียมเตตราบอเรต [$Na_2B_4O_7.7H_2O$] 0.23 กรัม

- แอมโมเนียมโมลิบเดต [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$] 0.1 กรัม

- กรดไฮโดรคลอริค 35 % [HCl] 10 มิลลิลิตร

การเตรียมอาหารสูตรเกลือแร่นี้ ต้องทำการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนจากไอน้ำที่ความดัน 1.5 บาร์ เป็นเวลา 20 นาที โดยต้องแยกกลูโคส และแมกนีเซียมซัลเฟตออกจากกัน ก่อนทำการฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นจึงผสมกันด้วยวิธีแบบปลอดเชื้อ

4.4.4 อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมัก(Fermentor)

ใช้อาหารสูตรเกลือแร่ (mineral salts medium) ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

กลูโคส [glucose]	20	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต [$MgSO_4.7H_2O$]	1.2	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]	4	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต [KH_2PO_4]	13.3	กรัม
กรดซิตริก (citric acid)	1.7	กรัม
สารละลายอาหารเสริม (trace element)	10	มิลลิลิตร

การเตรียมอาหารสูตรเกลือแร่นี้ ต้องทำการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนจากไอน้ำที่ความดัน 1.5 บาร์ เป็นเวลา 20 นาที โดยต้องแยกกลูโคส และแมกนีเซียมซัลเฟตออกจากกัน ก่อนทำการฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นจึงผสมกันด้วยวิธีแบบปลอดเชื้อ แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 6.8 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

4.5 วิธีการทดลอง

4.5.1 กระบวนการหมัก(Fermentation)

4.5.1.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้น

ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาบนอาหารอุดมแบบแข็งเอียงลงในอาหารอุดมแบบเหลวทิ้วไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้หัวเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้น 100 มิลลิลิตร

4.5.1.2 วิธีการหมัก

ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบกึ่งต่อเนื่องในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยใช้ปริมาตรเริ่มต้น 5 ลิตร ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ทำให้ปลอดเชื้อด้วยไอน้ำร้อน (steam sterilization) จากนั้นถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้ลงในถังหมักโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้น 10% ของปริมาตรการหมัก ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.8 ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ จนถึงช่วงจำกัดไนโตรเจนจึงเปลี่ยนมาใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์แทน และใช้อัตราการกวนที่ 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที และควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในช่วง 10-20 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมงเพื่อนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของน้ำตาลและความเข้มข้นของเซลล์ ทำการหมักจนกระทั่งความเข้มข้นของเซลล์คงที่ จึงทำการถ่ายเชื้อออกจากถังหมักด้วยวิธีปลอดเชื้อ (aseptic technic) เพื่อนำไปใช้ทดลองเรื่องการสกัดต่อไป

4.5.2 การวัดการเจริญของเชื้อ

4.5.2.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปิเปตน้ำหมัก 5 มิลลิลิตร ปั่นแยกและล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ถ่ายเซลล์ลงในถ้วย

อะลูมิเนียมที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแล้ว จากนั้นนำไปอบที่ 80 องศาเซลเซียส จนเซลล์แห้งแล้วนำมาใส่ในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักอีกครั้ง ทำซ้ำจนกระทั่งได้น้ำหนักเซลล์คงที่

4.5.2.2 การวัดค่าความขุ่น

ปั่นแยกเซลล์จากน้ำหมัก 5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที จากนั้นกระจายเซลล์ที่ได้ในน้ำกลั่น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าที่ได้หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งจากกราฟมาตรฐาน

4.5.3 การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส

ใช้วิธีของ Bernfeld (Ashwell, 1966) โดยปิเปตน้ำหมักที่ได้หลังจากการปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายกรดไนโตรซาลิไซลิกรีเอเจนต์ (dinitrosalicylic acid reagent: DNS reagent) ลงไป 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นในน้ำแข็ง 5 นาที เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วหาปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายกรดไนโตรซาลิไซลิกรีเอเจนต์ (dinitrosalicylic acid reagent: DNS reagent) ทำได้โดยละลายกรดไนโตรซาลิไซลิก 1 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ ปริมาณ 20 มิลลิลิตร เติมโซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตรท 30 กรัม แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บรรจุไว้ในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4.5.4 กระบวนการย่อยเซลล์ (Cell disruption)

4.5.4.1 การย่อยเซลล์โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ก่อนการสกัด

เซลล์เปียก 5 กรัมถูกกวนในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 100 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 15, 20, 25, 30, และ 35 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร ที่เวลา 2, 5, 10, 20, 30, 40,

และ 60 นาที ดึงตัวอย่างออกมา 10 มิลลิลิตรตามเวลา นำไปใส่ในขวดแก้วรูปทรงกรวยขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีคลอโรฟอร์มอยู่ ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเพื่อทำการสกัด

4.5.4.2 การย่อยเซลล์โดยใช้โฮโมจิไนเซอร์ก่อนการสกัด

เซลล์เปียก 5 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรถูกกวนด้วยโฮโมจิไนเซอร์ที่ความเร็วรอบ 8000, 9500, 13500, 20500, และ24000 รอบต่อนาที ที่เวลา 5, 10, 20, 30, 40, และ 60 นาที ดึงตัวอย่างออกมา 10 มิลลิลิตรตามเวลา นำไปใส่ในขวดแก้วรูปทรงกรวยขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีคลอโรฟอร์มอยู่ ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเพื่อทำการสกัด

4.5.4.3 การย่อยเซลล์โดยใช้คลื่นเหนือเสียงก่อนการสกัด

เซลล์เปียก 5 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำ 10 มิลลิลิตรของสารละลายใส่ในขวดเก็บตัวอย่างทรงสูง จากนั้นใช้คลื่นเหนือเสียงที่กำลัง 25 และ 50 วัตต์ เป็นเวลา 5, 10, 20, 30, 40, และ 60 นาทีตามลำดับ นำตัวอย่างที่ได้ไปใส่ในขวดแก้วรูปทรงกรวยขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีคลอโรฟอร์มอยู่ ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเพื่อทำการสกัด

4.5.4.4 เปรียบเทียบผลการย่อยเซลล์เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมโดยวิเคราะห์จากปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดได้

4.5.5 กระบวนการสกัดพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตจากถังกวนแบบไม่ต่อเนื่อง

4.5.5.1 การหาอัตราส่วนระหว่างวัฏภาคที่เหมาะสมในการสกัดพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตจากถังกวนแบบไม่ต่อเนื่อง

เซลล์เปียก 2.5 กรัม ในสารละลาย 50 มิลลิลิตร จากภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4.5.4 ถูกนำไปกวนกับคลอโรฟอร์ม ด้วยอัตราส่วนระหว่างคลอโรฟอร์มต่อสารละลายเป็น 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, และ 1.4 ตามลำดับ ในถังกวนแบบไม่ต่อเนื่องที่อัตราการกวน 450 รอบต่อนาที ที่เวลา 5 นาที เปรียบเทียบผลการทดลองโดยวิเคราะห์จากปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดได้

4.5.5.2 การหาอัตราการกวน และเวลา ที่เหมาะสมในการสกัดพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตจากถังกวนแบบไม่ต่อเนื่อง

เซลล์เปียก 2.5 กรัม ในสารละลาย 50 มิลลิลิตร จากภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4.5.4 ถูกนำไปกวนกับคลอโรฟอร์มด้วยอัตราส่วนระหว่างวัฏภาคที่เหมาะสมในถังกวนแบบไม่ต่อเนื่องที่อัตราการกวน 350, 450, 550, 650, และ 750 รอบต่อนาที ที่เวลา 5, 10, และ 20 นาทีตามลำดับ เปรียบเทียบผลการทดลองโดยวิเคราะห์จากปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดได้

4.5.5.3 การหาปริมาณของเซลล์ในสารละลายที่เหมาะสมในการสกัดพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตจากถังกวนแบบไม่ต่อเนื่อง

นำเซลล์เปียกมา 1, 2.5, 5.0, และ 7.5 กรัมตามลำดับ ใส่ในสารละลาย 50 มิลลิลิตร (คิดเป็นความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 20, 50, 100 และ 150 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) จากภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4.5.4 และถูกกวนกับคลอโรฟอร์มด้วยอัตราส่วนระหว่าง วัฏภาคที่เหมาะสม ที่อัตราการกวน 350, 450, 550, 650, และ 750 รอบต่อนาทีตามลำดับ ที่ระยะเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 4.5.5.2 ในถังกวนแบบไม่ต่อเนื่อง เปรียบเทียบผลการทดลองโดยวิเคราะห์จากปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดได้

4.5.6 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต และการวิเคราะห์ปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต

4.5.6.1 การนำเซลล์ไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (ส่งศรี, 1995)

นำเซลล์ 5 กรัมละลายน้ำ 100 มิลลิลิตร ดึงตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้วที่มีฝาเกลียวปิดขนาด 10 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนของเซลล์ไว้แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ หรือคลอรอกซ์ (clorox) 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงที่ 30 องศาเซลเซียส เติมน้ำกลั่นลงไป 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว

3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วยอะซีโตน 5 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม นำส่วนของตะกอนมาล้างด้วยเอทธานอลบริสุทธิ์ 99.8 % 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม เก็บส่วนของตะกอนไว้ เติมคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 30 วินาที ทิ้งไว้ให้เย็นนำไปปั่นเก็บส่วนใสไว้ นำส่วนที่เป็นตะกอนไปสกัดพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตอีกครั้ง รวมส่วนใสที่ได้ กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยมีหลอดที่มีขีดบอกปริมาตร 10 มิลลิลิตรรองรับ เติมคลอโรฟอร์มลงในหลอดแก้วจนปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตจะละลายอยู่ในคลอโรฟอร์ม เก็บส่วนนี้ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตต่อไป

4.5.6.2 การนำสารแขวนลอยของเซลล์ที่ทำปฏิกิริยาแล้วไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต

นำสารแขวนลอยของเซลล์ที่ทำปฏิกิริยาแล้วมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่ 25 องศาเซลเซียส จะได้สารละลายแบ่งเป็น 3 ชั้น โดยชั้นบนเป็นชั้นของสารละลาย ชั้นกลางเป็นเซลล์บางส่วนที่ไม่ถูกย่อย ส่วนชั้นล่างเป็นคลอโรฟอร์มที่มีพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตละลายอยู่ โดยจะนำเอาส่วนของชั้นล่างไปทำการวิเคราะห์ปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตต่อไป

4.5.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (สงศรี, 1995)

นำส่วนของพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตที่ละลายอยู่ในคลอโรฟอร์ม เจือจางด้วยคลอโรฟอร์มในอัตราส่วนที่เหมาะสมใส่ในหลอดแก้วปลายเปิด อบให้แห้งในตู้อบ 80 องศาเซลเซียส 10 นาที เพื่อให้ส่วนของคลอโรฟอร์มระเหยหมด นำส่วนของพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตที่อยู่ในหลอดมาเติมด้วยกรดซัลฟุริกเข้มข้น 3 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที ทิ้งให้เย็นในน้ำเย็น 10 นาที แล้วนำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มา

คำนวณหาปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยเปรียบเทียบกับกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร กับค่าความเข้มข้นของพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)

4.5.7 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดได้

นำตัวอย่างที่มีพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตละลายอยู่ในคลอโรฟอร์มส่วนหนึ่งไปวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (จากข้อ 4.5.6.3) และอีกส่วนหนึ่งนำไปตกตะกอนด้วยเฮกเซน แล้วกรองจะได้ตะกอนของพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่ 80 องศาเซลเซียส จึงนำไปชั่ง และความบริสุทธิ์ของพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตที่ได้หาได้จากความแตกต่างของปริมาณที่ได้จากการวัดทั้งสองแบบนี้

4.5.8 การศึกษาสมบัติของพอลิเมอร์โดยใช้เครื่อง NMR, GPC, DSC และ SEM

4.5.8.1 การศึกษาหมู่องค์ประกอบของพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยใช้เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR)

เตรียมสารละลายพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยใช้ $CDCl_3$ และสเปกตรัมของแสงจะถูกบันทึกที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ที่จังหวะเวลาซ้ำๆทุก 2.5 วินาที เพื่อวิเคราะห์หมู่องค์ประกอบของพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต

4.5.8.2 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยใช้เครื่องเจลเพอมิเอชันโครมาโทกราฟี (GPC)

ละลายพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 0.015 กรัมในคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยเยื่อแผ่นขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปฉีดเข้าเครื่องในปริมาณ 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต

4.5.8.3 การศึกษาอุณหภูมิหลอมตัวผลึก (T_m), อุณหภูมิแข็งตัวของผลึก (T_c) และพลังงานความร้อนที่ใช้หลอมตัวผลึก (ΔH) ของพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยใช้เครื่องดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิงคาลอริมิเตอร์ (DSC)

ในการทดลองโดยใช้พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตประมาณ 10-20 มิลลิกรัม ใช้อุณหภูมิเริ่มต้นที่ –20 องศาเซลเซียสจนถึง 200 องศาเซลเซียส ที่อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสต่อนาที และไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจนที่ 20 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อหาอุณหภูมิหลอมตัวผลึก (T_m), อุณหภูมิแข็งตัวของผลึก (T_c), และพลังงานความร้อนที่ใช้หลอมตัวผลึก(ΔH)

4.5.8.4 การศึกษาลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์มพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ทำให้พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตอยู่ในรูปของฟิล์มโดยการระเหยคลอโรฟอร์ม จากนั้นใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนไมโครสโคปส่องกราดลงบนพื้นผิวของแผ่นฟิล์มพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ด้วยกำลังขยาย 1000 เท่า เพื่อดูลักษณะพื้นผิว และถ่ายรูปไว้

4.5.8.5 การศึกษาการสลายตัวในสิ่งแวดล้อมต่างๆของพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต

ทำให้พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตอยู่ในรูปของฟิล์มโดยการระเหยคลอโรฟอร์มออก จะได้น้ำหนักฟิล์มประมาณ 0.15 กรัม เส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 90 มิลลิเมตร และความหนาประมาณ 0.033 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปไว้ในสิ่งแวดล้อมที่ต่างกันคือ ดิน น้ำ และอากาศ เพื่อดูการสลายตัวของพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยเก็บตัวอย่างมาชั่งน้ำหนักเป็นระยะๆ และถ่ายรูปไว้