บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

2.1.1 อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
กล้องจุลทรรศน์ รุ่น Labophot II	Nikon ประเทศญี่ปุ่น
อุปกรณ์ถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ รุ่น AFX-DX	Nikon ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (gas chromatography) รุ่น 3400CX	Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องสำหรับฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ (auto sampler) รุ่น 8200CX	Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา
แคปพิลลารีคอลัมน์ (capillary column) ชนิด carbowax-PEG เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มม. ความยาว 60 ม.	Restex ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องผลิตก๊าซไฮโดรเจน (hydrogen generator) รุ่น 9200	Packard ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องผลิตก๊าซออกซิเจน (air compressor) รุ่น WL 505000 AJ	Campbell Hausfeld ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psychotherm incubator shaker) รุ่น G27 แบบหมุน (rotary)	New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น A200S	Sartorius ประเทศเยอรมัน
เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น L2200P	Sartorius ประเทศเยอรมัน
เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KS-3000P	Kubota ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ รุ่น Centrikon T-42K	Kontron ประเทศอิตาลี
เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ รุ่น J2-21	Beckman ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องระเหิดแห้ง (Lyophillizer) รุ่น Eyela FD-1	Tokyo Rikakikai ประเทศญี่ปุ่น

2.1.1 อุปกรณ์ (ต่อ)

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟฟี (high performance liquid chromatography : HPLC) รุ่น LC-3A	Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer) รุ่น UV-160A	Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (VIS spectrophotometer) รุ่น Novaspec II	Pharmacia Biotech ประเทศอังกฤษ
เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น 2000	Cyberscan ประเทศสิงคโปร์
ชุดสกัดสาร (soxhlet apparatus) ขนาด 1000 มิลลิลิตร	BRAND ประเทศเยอรมัน
ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124	ISSCO ประเทศสหรัฐอเมริกา
ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น BM800	Memmert ประเทศเยอรมัน
ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UL60	Memmert ประเทศเยอรมัน
ตู้อบแห้ง (dryer oven) รุ่น UL80	Memmert ประเทศเยอรมัน
หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325	Tomy ประเทศญี่ปุ่น
อ่างน้ำเดือด (water bath) รุ่น W760	Memmert ประเทศเยอรมัน
อุปกรณ์หล่อเย็น (circulation cooler)	Marubishi ประเทศญี่ปุ่น

2.1.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1,4-บิวเทนไดออล [$C_4H_{10}O_2$]	Aldrich Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
1-บิวทานอล [$C_4H_{10}O$]	BDH Laboratory ประเทศอังกฤษ
1-ออกทานอล [$C_8H_{18}O$]	BDH Laboratory ประเทศอังกฤษ
กรดซัคซินิก [$C_4H_6O_4$]	May & Baker ประเทศอังกฤษ
กรดซัลฟูริกเข้มข้น [H_2SO_4]	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
กรดซิตริก [$C_6H_8O_7.H_2O$]	Reidel ประเทศอังกฤษ
กรดบอริก [H_3BO_3]	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน

2.1.2 เคมีภัณฑ์ (ต่อ)

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
กรดบิวทิริก [$C_4H_8O_2$]	J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดเบนโซอิก [$C_7H_6O_2$]	Nacalai Tesque ประเทศญี่ปุ่น
กรดโพรพิโอนิก [$C_3H_6O_2$]	BDH Laboratory ประเทศอังกฤษ
กรดวาเลอริก [$C_5H_{10}O_2$]	Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดอะซิติก [$C_2H_4O_2$]	J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดอะมิโน : ทรีโอนีน เมทไธโอนีน ลิวซีน วาลีน อาร์จินีน ไอโซลิวซีน	Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
กลีเซอรอล [$C_3H_8O_3$]	Univar ประเทศออสเตรเลีย
กลูโคส [D(+)glucose monohydrate : $C_6H_{12}O_6$]	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
กากน้ำตาล (molasses)	ไทยเมจิฟาร์มาซูติคัล ประเทศไทย
กาแลกโตส [D-galactose : $C_6H_{12}O_6$]	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
คลอโรฟอร์ม [CH_3Cl]	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต [$CuSO_4.5H_2O$]	J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต [$CaCl_2.2H_2O$]	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต [$CoCl_2.6H_2O$]	Carlo Erba ประเทศอิตาลี
ซอร์บิทอล (D-sorbitol)	Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต [$ZnSO_4.7H_2O$]	Carlo Erba ประเทศอิตาลี
ซูโครส (น้ำตาลทราย)	มิตรผล ประเทศไทย
ซูโครส [$C_{12}H_{22}O_{11}$]	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
โซเดียม-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต [$C_4H_7O_3Na$]	Wako Pure ประเทศญี่ปุ่น
โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต [$C_4H_7O_3Na$]	Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
โซเดียมคลอไรด์ [NaCl]	ปรุงทิพย์ ประเทศไทย
โซเดียมเบนโซเอต [$C_7H_5O_2Na$]	Nacalai Tesque ประเทศญี่ปุ่น
โซเดียมโพรพิโอเนต [$C_3H_5O_2Na$]	Fluka ประเทศเยอรมัน
โซเดียมแลกเตต [$C_4H_5O_3Na$]	Fluka ประเทศเยอรมัน
โซเดียมวาเลอเรต [$C_5H_9O_2Na$]	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
โซเดียมอะซิเตตไตรไฮเดรต [$C_2H_3O_2Na.3H_2O$]	Carlo Erba ประเทศอิตาลี

2.1.2 เคมีภัณฑ์ (ต่อ)

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
โซเดียมไฮดรอกไซด์ [NaOH]	Carlo Erba ประเทศอิตาลี
โซเดียมไฮโปคลอไรท์ [NaOCl]	Clorox ประเทศสหรัฐอเมริกา
ไดคลอโรมีเทน [CH_2Cl_2]	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต [Na_2HPO_4]	Fluka ประเทศเยอรมัน
น้ำมันถั่วเหลือง	หยก ประเทศไทย
น้ำมันปาล์มโอเลอีน	แวว ประเทศไทย
น้ำมันมะกอก	ศิริบัญชา ประเทศไทย
น้ำมันเมล็ดทานตะวัน 100 %	ชิม ประเทศไทย
น้ำมันรำข้าว	คิง ประเทศไทย
นิกเกิลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต [$NiCl_2.6H_2O$]	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-14% 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)	Aldrich Chemical ประเทศญี่ปุ่น
พอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทิเรต	Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
พอลิเปปโตน (polypeptone)	Becton Dickinson ประเทศสหรัฐอเมริกา
พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (DMAB)	Carlo Erba ประเทศอิตาลี
โพแตสเซียมคลอไรด์ [KCl]	Carlo Erba ประเทศอิตาลี
โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต [KH_2PO_4]	Univar ประเทศออสเตรเลีย
โพรพานอล [C_3H_8O]	May & Baker ประเทศอังกฤษ
ฟรักโตส [D(-)fructose : $C_6H_{12}O_6$]	Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต [$FeSO_4.7H_2O$]	Unilab ประเทศสหรัฐอเมริกา
มอลโตส (maltose)	Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
เมทานอล [CH_3OH]	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต[$MgSO_4.7H_2O$]	Carlo Erba ประเทศอิตาลี
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต[$MnCl_2.4H_2O$]	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
แมนนิทอล (D-manitol)	Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
ยูเรีย [N_2H_4CO]	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
แลกโตส (lactose)	Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.2 เคมีภัณฑ์ (ต่อ)

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	Deutsche Hefewerke Gmbh & Co.
อะซีโตน [C_3H_6O]	J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
เอทานอล [C_2H_5OH]	E. Merck Damstadt ประเทศเยอรมัน
เอนไซม์อินเวอร์เทส (gradeV EC3.2.1.26)	Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
แอมโมเนียมคลอไรด์ [NH_4Cl]	Riedel ประเทศเยอรมัน
แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]	May & Baker ประเทศอังกฤษ
แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$]	J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
ไอโซออกเทน [C_8H_{18}]	Fluka ประเทศเยอรมัน

2.2 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้คือ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BA-019 ซึ่งแยกและคัดเลือกโดย รัตนศิริ มุทิตากุล (2538)

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อคืออาหารนิวเตรียนท์ (nutrient agar) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

พอลิเปปโตน	5	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที ซึ่งเป็นภาวะมาตรฐาน

2.3.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed culture medium) ใช้สูตรของ Doi และคณะ(1986) ซึ่งศึกษาโดยรัตนศิริ มุทิตากุล (2538) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

ฟรักโตส	10	กรัม

สารสกัดจากยีสต์	10	กรัม
พอลิเปปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.2 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน ส่วนน้ำตาลแยกละลายและนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

2.3.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตพอลิเมอร์ คืออาหาร MSM (Mineral Salt Medium) ซึ่งปรับปรุงโดยรัตนศิริ มุทิตากุล (2538) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

แหล่งคาร์บอน	20.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1.0	กรัม
โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.1	กรัม
สารละลาย trace element	1.0	มิลลิลิตร

แยกละลายเกลือแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตและ trace element เมื่อละลายแล้วจึงนำมารวมกัน ปรับ pH ที่เหมาะสม และนึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน

สารละลาย trace element สูตรเดิมใน 1 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริก 1 ลิตร ประกอบด้วย

แคลเซียมคลอไรด์	20.0	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	1.3	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดต	0.6	กรัม
กรดบอริก	0.6	กรัม

2.4 วิธีการเก็บรักษาเชื้อและเตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

2.4.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) สำหรับเก็บรักษาเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาเขี่ยลากเชื้อลงบนอาหารใหม่ (sub culture) ทุก 3 เดือน

2.4.2 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

นำเชื้อที่เก็บรักษาไว้มาเขี่ยลากเชื้อลงบนอาหารใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเติบโตดีแล้วถ่ายเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ กระจายเชื้อ (resuspend) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5

2.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีของ *Bacillus* sp. BA-019

นำ *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งเลี้ยงในอาหารนิวเตรียนท์อายุ 24 ชั่วโมง มาย้อมสีแบบแกรม (Gram's stain) และย้อมสีแบบเนกาทีฟ (negative stain) ด้วยสีไนโกรซิน (nigrosin) และทดสอบกิจกรรมเอนไซม์คาตาเลส (catalase activity) ทดสอบการใช้ซิเตรต (citrate utilization) การย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction) การย่อยแป้ง (starch hydrolysis) การรีดิวซ์ไนเตรต (nitrate reduction) การย่อยโปรตีน (protein hydrolysis) การทดสอบ Voges-Proskauer (MR-VP) ทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตบางชนิด คือ ดีแมนิทอล (D-manitol) ดีไซโลส (D-xylose) แอลอะราบิโนส (L-arabinose) กลูโคส ทดสอบการเจริญบนเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ และการทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 5 ถึง 60 องศาเซลเซียส (Bergey และคณะ, 1986)

2.6 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 2.4.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร (2 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร แหล่งคาร์บอนที่ศึกษาได้แก่ กลูโคส ซูโครส และน้ำตาลทราย (มีซูโครสปริมาณ 94% จากการวิเคราะห์โดย HPLC ภาคผนวก ค) ความเข้มข้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร โดยเปรียบเทียบกับสูตรอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อเดิม (Doi และคณะ, 1986) ซึ่งใช้ฟรักโตสเป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5 เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงการเจริญเติบโต แล้วเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเลี้ยงกล้าเชื้อ เพื่อการศึกษาขั้นต่อไป

2.7 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนเดี่ยวต่อชนิดและสัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณพอลิเมอร์

นำกล้าเชื้อที่เหมาะสมซึ่งได้จากการศึกษาในข้อ 2.6 ถ่ายลงในอาหารสำหรับการผลิตซึ่งประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนเดี่ยวในกลุ่มต่างๆ ได้แก่

2.7.1 **น้ำมันพืชชนิดต่างๆ** คือ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะกอก น้ำมันรำข้าว และน้ำมันเมล็ดทานตะวัน ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร

2.7.2 **แอลกอฮอล์บางชนิด** คือ เมทานอล เอทานอล โพรพานอล 1-บิวทานอล 1,4-บิวเทนไดออล และ 1-ออกทานอล ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร

2.7.3 **เกลือของกรดบางชนิด** คือ โซเดียมอะซิเตต โซเดียม-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต โซเดียมแลกเตต โซเดียมเบนโซเอต ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร

2.7.4 **น้ำตาลบางชนิด** คือ ไซโลส กลูโคส ฟรักโตส กาแลกโตส มอลโตส แลกโตส ซูโครส และแมนนิทอล ปริมาณ 10 และ 20 กรัมต่อลิตร

เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5 เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 24 นำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้

2.8 การศึกษาผลของซับสเตรตต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV

2.8.1 ผลของแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทรายกับกรดและเกลือของกรดบางชนิด

ศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนผสมที่มีผลต่อการวิเคราะห์ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ โดยนำกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากผลการวิจัยข้อ 2.6 ถ่ายลงในอาหารสำหรับการผลิตที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลทราย 19 กรัมต่อลิตร กับกรดอะซิตริก กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก กรดซัคซินิก กรดวาเลอริก หรือกรดซิตริก อย่างใดอย่างหนึ่ง ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5 เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 24 นำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ เมื่อได้ชนิดของแหล่งคาร์บอนผสมที่เหมาะสม จึงศึกษาปริมาณ

ของแหล่งคาร์บอนผสมในสัดส่วนระหว่างน้ำตาลต่อกรด เท่ากับ 18:2 17:3 16:4 15:5 และ 14:6 เมื่อได้ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนผสมที่เหมาะสมจึงศึกษาปริมาณของกรดเปรียบเทียบกับเกลือโซเดียมของกรด

2.8.2 ผลของชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

ศึกษาชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการสังเคราะห์ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ โดยนำกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากผลการวิจัยข้อ 2.6 ถ่ายลงในอาหารสำหรับการผลิตที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนผสมที่ได้จากผลการวิจัยข้อ 2.8.1 แหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ สารสกัดจากยีสต์ และยูเรีย ที่มีปริมาณธาตุไนโตรเจนเท่ากับธาตุไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0 ถึง 3.0 กรัมต่อลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5 เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 24 นำไปวัดค่า pH วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ และปริมาณของไนโตรเจนที่เหลือ

2.9 การศึกษาภาวะในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ที่มีผลต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV

นำกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากการวิจัยข้อ 2.6 ถ่ายลงในอาหารสำหรับการผลิตโดยใช้ซับสเตรตจากการวิจัยข้อ 2.8 มาศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณโคพอลิเมอร์ ดังนี้

2.9.1 **ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)** ของอาหารสำหรับการผลิต โดยปรับ pH ให้ได้ค่า pH เริ่มต้น เท่ากับ 6.0 ถึง 8.5

2.9.2 **ปริมาณอากาศ** ให้อากาศปริมาณแตกต่างกันโดยแปรผันปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 25 ถึง 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร

เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 24 30 และ 36 นำไปวัดค่า pH วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้

2.10 การศึกษาผลของคาร์บอนและไนโตรเจนต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV

2.10.1 ผลการใช้โซเดียมโพรพิโอเนต หรือโซเดียมวาเลอเรตเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว

นำกล้าเชื้อที่เตรียมได้ตามวิธีข้อ 2.6 ถ่ายลงในอาหารสำหรับการผลิตโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อจากข้อ 2.9 ศึกษาปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต 5 10 15 20 กรัมต่อลิตร และโซเดียมวาเลอเรต 5 10 15 20 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณคาร์บอนที่เหลือ สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้

2.10.2 อัตราส่วนของน้ำตาลทรายต่อเกลือโพรพิโอเนตและวาเลอเรต

นำกล้าเชื้อที่เตรียมได้ตามวิธีข้อ 2.6 ถ่ายลงในอาหารสำหรับการผลิตโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อจากข้อ 2.9 ศึกษาปริมาณของ

โซเดียมโพรพิโอเนต 5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลทราย 5 10 15 20 กรัมต่อลิตร
โซเดียมวาเลอเรต 5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลทราย 5 10 15 20 กรัมต่อลิตร
โซเดียมโพรพิโอเนต 10 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลทราย 5 10 15 20 กรัมต่อลิตร
โซเดียมวาเลอเรต 10 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลทราย 5 10 15 20 กรัมต่อลิตร

เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณคาร์บอนที่เหลือ สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้

2.10.3 อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน

ใช้ภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนจากผลการทดลองข้อ 2.10.2 มาแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนผสม (น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตรกับโซเดียมวาเลอเรต 5 กรัมต่อลิตร) ต่อไนโตรเจน (ยูเรีย) เท่ากับ 10 ถึง 500 นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 24 36 และ 48 นำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้

2.11 การศึกษาผลของเกลือแร่ที่สำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV

โดยใช้นำภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อตามข้อ 2.10 มาศึกษาผลของเกลือแร่ที่สำคัญบางชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.11.1 **โพแตสเซียม** โดยแปรผันในรูปของโพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 0 ถึง 5 กรัมต่อลิตร

2.11.2 **แมกนีเซียม** โดยแปรผันในรูปของแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0 ถึง 0.4 กรัมต่อลิตร

นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 24 36 และ 48 นำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้

2.12 ผลของซับพลีเมนต์ (supplement) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV

2.12.1 **กรดอะมิโน** ได้แก่ ทรีโอนีน เมทไธโอนีน ลิวซีน วาลีน อาร์จินีน ไอโซลิวซีน ปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.12.2 **กรดอินทรีย์** ได้แก่ โซเดียมซัคซิเนต โซเดียมซิเตรต โซเดียมอะซิเตต และกรดโอลิอิก ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร

นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 24 36 และ 48 นำไปวัดค่า pH วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้

2.13 การวัดค่าความเป็นกรดด่าง

ใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)

2.14 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำเซลล์ที่แยกได้จากการปั่นน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม อบเซลล์ที่ผ่านการ

ปั่นล้างแล้วในถ้วยอลูมิเนียมที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 18 - 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักถ้วย คำนวณหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

2.15 การวิเคราะห์สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณของโคพอลิเมอร์โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟฟี (Gas Chromatography : GC)

ใช้วิธีของ Comeau และคณะ (1988) โดยทำการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก โดยปั่นที่ 3000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์มาละลายในน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร เทใส่ขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร นำไประเหิดแห้งภายใต้สูญญากาศ ชั่งเซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัมใส่หลอดฝาเกลียว เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร เติมเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 3 (3% acidified methanol) 2 มิลลิลิตรที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3.5 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงนาน 5 นาทีและปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บชั้นคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) ซึ่งมีอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ของโมโนเมอร์ ไปสกัดแยกกรดและกากเซลล์ด้วยน้ำกลั่นตามวิธีข้างต้นอีกครั้ง แต่เติมน้ำกลั่นเพียง 0.5 มิลลิลิตร ถ่ายชั้นคลอโรฟอร์มใส่หลอดฝาเกลียวสำหรับวิเคราะห์ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟฟี ระเหยคลอโรฟอร์มออกให้หมด เติมไอโซออกเทน 1 มิลลิลิตรแล้ววิเคราะห์สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณของโคพอลิเมอร์โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟฟี ภายใต้ภาวะดังนี้

ชนิดของ column	:	แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด cabowax-PEG เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 60 เมตร
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)	:	ก๊าซไนโตรเจนอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	:	1 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์ชนิดของโมโนเมอร์โดยการเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของสารตัวอย่างกับเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารละลายมาตรฐาน PHB และ P(3HB-co-14%3HV) (ภาคผนวก ข) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

การแสดงปริมาณโคพอลิเมอร์นิยมแสดงเป็นปริมาณต่อปริมาตรของอาหารที่ใช้เลี้ยง (กรัมต่อลิตร) หรือ แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของปริมาณต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ของ 2HB 3HB 4HB และ 3HV (กรัมต่อลิตรต่อ lyophilized cell 20 มิลลิกรัม) โดยใช้โปรแกรม Star chromatogram:version 4.02 ซึ่งจะทำการคำนวณปริมาณโมโนเมอร์โดยมีสารมาตรฐานภายในเป็นกรดเบนโซอิก 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่มำการวิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน แสดงโครมาโตแกรมและกราฟมาตรฐานของสารต่างๆ ในภาคผนวก ค

2.16 การหาปริมาณซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้เอนไซม์อินเวอร์เตส (invertase) โดยนำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์แล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เตส 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 4.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธีของ Bernfeld (1955) ต่อโดยเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid หรือ DNSA reagent) ภาคผนวกที่ ก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างซูโครสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

2.17 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)

เตรียมน้ำตาลที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 20 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำส่วนที่กรองได้ไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์หาน้ำตาลกลูโคส ฟรักโตสและซูโครส โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีก (peak area) ของน้ำตาลแต่ละชนิดกับน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด โดยวิเคราะห์ภายใต้ภาวะดังนี้ (ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

ชนิดของคอลัมน์	:	Phenomenax Spherisorb NH_2 LCD
ชนิดของดีเทคเตอร์	:	Refractive Index Detector
Flow rate	:	2 มิลลิลิตรต่อนาที
Mobile phase	:	90 % อะซีโตไนไตรล์ในน้ำ (ปริมาตรต่อปริมาตร)
ปริมาตรสารตัวอย่าง	:	5 ไมโครลิตร

2.18 การวิเคราะห์หาปริมาณของโพรพิโอเนตและวาเลอเรตโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟฟี

ใช้วิธีของ Ramsay และคณะ (1990) โดยนำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดฝาเกลียว เติมเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 3 (3% acidified methanol) 2 มิลลิลิตรที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นและไดคลอโรมีเทนอย่างละ 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงนาน 5 นาทีและปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บชั้นไดคลอโรมีเทน (ชั้นล่าง) ซึ่งมีอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ของโมโนเมอร์ ใส่หลอดเกลียวสำหรับวิเคราะห์ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟฟี ภายใต้สภาวะเดียวกับการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของโคพอลิเมอร์ แล้ววิเคราะห์ปริมาณโพรพิโอเนตและวาเลอเรตโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟฟี ภายใต้ภาวะดังนี้

ชนิดของ column	:	แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด cabowax-PEG เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 60 เมตร
อุณหภูมิของ injector	:	250 องศาเซลเซียส (isothermal)
อุณหภูมิของ column	:	130 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 15 องศาเซลเซียสต่อนาที รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 180 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ detector (FID)	:	250 องศาเซลเซียส (isothermal)
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	:	ก๊าซไนโตรเจนอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	:	1 ไมโครลิตร

การคำนวณปริมาณโพรพิโอเนตและวาเลอเรตโดยใช้โปรแกรม Star chromatogram : version 4.02 ซึ่งจะทำการคำนวณปริมาณโมโนเมอร์โดยมีสารมาตรฐานภายในเป็นกรดเบนโซอิก 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน แสดงโครมาโตแกรมและกราฟมาตรฐานของสารต่างๆ ในภาคผนวก ค

2.19 การหาปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจนในน้ำหมัก

ใช้วิธีของ Kemper (1974) โดยนำน้ำหมักที่ทำการปั่นแยกเซลล์ออกแล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 20 x 150 มิลลิเมตร เติมโพแตสเซียมคลอไรด์ (ภาคผนวก ก) ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลาย EDTA (ภาคผนวก ก) 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้นาน 1 นาที จากนั้นเติมฟีนอลไนโตรพัสซายด์รีเอเจนต์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรท์รีเอเจนต์ (ภาคผนวก ก) 4 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจน และค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

2.20 การหาปริมาณยูเรียในน้ำหมัก

ตามวิธีของ AOAC (1995) โดยนำน้ำหมักที่ทำการปั่นแยกเซลล์ออกแล้วมาเจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายพาราไดเทธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (DMAB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในส่วนใสปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่ได้จากการปั่นแยกน้ำหมักที่ใส่ในหลอดทดลอง นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณยูเรียกับค่าการดูดกลืนแสง (ภาคผนวก ค) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

2.21 การศึกษาลักษณะของเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อสะสม PHA ไว้ภายในเซลล์ โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

โดยนำเซลล์ที่มีการผลิตและสะสมพอลิเมอร์จากการเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตที่ชั่วโมงที่ 48 ไปเตรียมตัวอย่างเพื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่าน (Tranmission Electron Microscope : TEM) โดยนำตัวอย่างมาตรึง (fixation) ด้วยออสเมี่ยมนาน 1 ถึง 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นขจัดน้ำออกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์แล้วแทนที่น้ำด้วยเรซิน นำไปฝังในตัวกลาง (epoxy polyester) แล้วทำให้แข็ง (polymerize) ตัดด้วยเครื่องอัลตราไมโครโตม วางตัวอย่างลงบนแผ่นตาข่ายทองแดงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.05 มิลลิเมตร (grid) ย้อมด้วยโลหะหนักเพื่อทำให้ส่วนต่างๆของตัวอย่างมีลักษณะทึบต่อลำแสงอิเล็กตรอน จากนั้นนำตัวอย่างไป

ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

2.22 การสกัดโคพอลิเมอร์

วิธีการสกัดโคพอลิเมอร์ด้วยชุด Soxhlet apparatus (รูปที่ 8) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่สามารถใช้คลอโรฟอร์มสกัดโคพอลิเมอร์ออกจากเซลล์ โดยใช้ตัวทำละลายหมุนเวียนในการสกัดได้หลายครั้ง ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถลดต้นทุนในขั้นตอนการสกัด และทำให้บริสุทธิ์ (สุชาดา จันทร์ประทีป, 2539)

รูปที่ 8 ชุดสกัด Soxhlet apparatus