บทที่ 2

อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์ และเคมีภัณฑ์

2.1.1 อุปกรณ์

เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น G-10 แบบ rotary ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. USA.

เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman USA.

เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น L2200P ของบริษัท Sartorius Germany

เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น A200S ของบริษัท Sartorius Germany

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของบริษัท Shimadzu Japan

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning USA.

ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124 ของบริษัท IS SCO USA.

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation Japan

เครื่องหมัก (fermentor) รุ่น MD 300 ขนาด 5 ลิตร และชุดควบคุมสภาวะของบริษัท L.E. Marubishi Co. Ltd. Japan

เครื่องทำระเหิดแห้งระบบสูญญากาศ (lyophilizer) รุ่น Eyela FD-1 ของบริษัท Tokyu Rikakikai Co., Ltd Japan

เครื่องก๊าซโครมาโตรกราฟี (gas chromatography) รุ่น HP 5890 Series II ของบริษัท Hewlett Packard USA. วิเคราะห์ข้อมูลโดยคอมพิวเตอร์

และโปรแกรมสำเร็จรูป Chrom-card ของบริษัท Fisons Instruments

แคปพิลลารีคอลัมน์ (capillary column) ชนิด FFAP เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2 มล. ความยาว 25 เมตร ของบริษัท Hewlett Packard USA.

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์โครมาโตรกราฟี (high performance liquid chromatography:HPLC) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu

เครื่องหาน้ำหนักโมเลกุล (gel permeation chromatography:GPC) รุ่น Water 150-CV ของบริษัท Waters

เครื่องหาอุณหภูมิหลอมเหลว (Tm) และ glass transition temperature (Tg) (differential scaning colorimeter) ของ Perkin Elmer ที่ศูนย์เทคโนโลยีและวัสดุแห่งชาติ

เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซเนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (nuclear magnetic resonance spectrometer) รุ่น ACF 200 ของบริษัท Bruker

เครื่องวัดคุณสมบัติเชิงกลของพลาสติก (Universal testing machine) siries IX Automated Materials Testing System 7.00.00 ของบริษัท Instron USA. ของศูนย์โลหะและวัสดุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.2 <u>เคมีภัณฑ์</u>

กรดออกทาโนอิก ($C_8H_{16}O_2$) ของบริษัท E. Merck Damstadt Germany

กรดวาเลอริก ($C_5H_{10}O_2$) ของบริษัท Sigma Chemical

กรดบิวทิริก ($CH_3CH_2CH_2COOH$) ของบริษัท E. Merck Damstadt Germany

กรดโพรพิโอนิก ($C_3H_6O_2$) ของบริษัท BDH England

โซเดียมอะซิเตท (CH_3COONa) ของบริษัท E. Merck Damstadt Germany

น้ำมันปาล์ม ตราพาโมลา ของบริษัทพาโมลา จำกัด

น้ำมันถั่วเหลือง ตราองุ่น ของบริษัทน้ำมันพืชไทย จำกัด

น้ำมันถั่วเหลืองผสมน้ำมันเมล็ดฝ้าย ตราทิพ ของบริษัทอุสาหกรรมวิวัฒน์ จำกัด

น้ำมันเมล็ดทานตะวัน ตรา Sunlight nesson ของบริษัท เบียทริส/ฮันส์ เวสสัน อิงค์ อเมริกา

น้ำมันข้าวโพด ตรา Mazola ของบริษัท ซีพีซี/อาย (ประเทศไทย) จำกัด

เมทธานอล ของบริษัท E. Merck Damstadt Germany

เอทธานอล ของบริษัท E. Merck Damstadt Germany

บิวทานอล ของบริษัท E. Merck Damstadt Germany

แมนนิทอล ของบริษัท Difco Laboratories USA.

ซอร์บิทอล ของบริษัท Difco Laboratories USA.

กลีเซอรอล ของบริษัท Difco Laboratories USA.

ฟรุกโตส ของบริษัท E. Merck Damstadt, Germany

กรดเบนโซอิก (C_6H_5COOH) ของบริษัท Nacalai tesque Inc. Japan

โซเดียม-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรท ($CH_3CH(OH)CH_2COONa$) ของบริษัท Wako Pure Chemical Industries Ltd. Janpan

โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท ($C_4H_7O_3Na$) ของบริษัท Sigma Chemical

โพลี(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรท-24 % 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรท) ของบริษัท Aldrich Chemical Company Inc.

คลอโรฟอร์ม ของบริษัท BDH England

อะซิโตน ของบริษัท BDH England

กรดซัลฟุริกเข้มข้น ของบริษัท E. Merck Damstadt Germeny

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ของบริษัท May & Baker Laboratory Chemical England

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรท ($Na_2HPO_4.2H_2O$) ของบริษัท Riedel-de Heanag Speelze England

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท E. Merck Damstadt Germany

โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Carlo Erba Italy

คลอรอกซ์ (chlorox) ของบริษัท The Chlorox company USA.

เคมีภัณฑ์ชนิดอื่นๆ เป็นเคมีภัณฑ์ระดับวิเคราะห์ (analytical reagent grade) จากบริษัทต่างๆ ซึ่งนำมาใช้โดยไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์อีก

สารอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ (media) เช่นผงยีสต์สกัด สารสกัดจากเนื้อและเปปโตน ของบริษัท Difco USA. และโพลีเปปโตน เป็นของบริษัท Becton Dickinson

USA.

ถุงพลาสติกที่ผลิตจาก PP และ PE

2.2 จุลินทรีย์

Alcaligenes sp. A-04 เป็นสายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกโดยอรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) ซึ่งสามารถสร้างและสะสมโพลีเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรท (PHB)

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (stock culture medium) ใน 1 ลิตรประกอบด้วย

สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที (การนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน)

2.3.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับการเตรียมกล้าเชื้อ (starter)

สูตรที่ 1 (Doi และ คณะ , 1986) ใน 1 ลิตรประกอบด้วย

ผงสกัดจากยีสต์	10	กรัม
โพลีเปปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

สูตรที่ 2 (Doi และ คณะ , 1988) ใน 1 ลิตรประกอบด้วย

ผงสกัดจากยีสต์	10	กรัม
โพลีเปปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	5	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	5	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

2.3.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อการผลิตโคโพลีเมอร์

MSM (Mineral salt medium) สูตรปรับปรุงโดย อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) ใน 1 ลิตรประกอบด้วย

แหล่งคาร์บอน	20.00	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	0.10	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.00	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (NA_2HPO_4)	0.30	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.05	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	0.10	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	20.00	มก.
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	1.30	มก.
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.20	มก.
แอมโมเนียโมลิบเดตเตตระไฮเดรต ($(NH_4)_6MO_7O_{24}.4H_2O$)	0.60	มก.
กรดบอริก (H_3BO_3)	0.60	มก.

แยกละลาย trace elements แล้วจึงนำมารวมกับสารละลายเกลือ และผงสกัดจากยีสต์ ชั่งแหล่งคาร์บอน และตวง MSM 50 มล. ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 และ 3 โมลาร์ นำมานึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน เพื่อความสะดวกและเข้าใจจึงเรียกสูตรอาหารเหลวนี้ว่า อาหาร MSM

2.4 <u>วิธีการเก็บรักษา การเตรียมหัวเชื้อ(inoculum) สำหรับเลี้ยงเป็นกล้าเชื้อ (starter) และการคัดเลือกอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ</u>

2.4.1 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) สำหรับเก็บรักษาเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเติบโตดีแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4° ซ นำมาเขี่ยลากเชื้อลงบนอาหารใหม่ (sub culture) ทุกๆ 1 เดือน

2.4.2 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงเป็นกล้าเชื้อ

นำเชื้อที่เก็บรักษาไว้มาเขี่ยลากเชื้อลงบนอาหารใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 24ชม. เมื่อเชื้อเติบโตดีแล้วจึงเขี่ยและนำมาแขวนลอยใหม่ (resuspend) ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ นำเชื้อที่กระจายในน้ำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร (OD_{660}) ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.35-0.40 ถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 1 มล. (2% โดยปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ

2.4.3 การคัดเลือกอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ และเวลาในการเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมกล้าเชื้อ เพื่อให้ได้เชื้อเริ่มต้นปริมาณมาก (ขั้นตอนที่ 1)

นำหัวเชื้อจาก 2.4.2 ใส่ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อสูตรที่ 1 และ 2 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30° ซ โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 40 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และน้ำหนักแห้ง นำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเติบโตเพื่อคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมกล้าเชื้อ เพื่อให้ได้ปริมาณมากและเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงกล้าเชื้อ

2.4.4 การเตรียมกล้าเชื้อสำหรับการผลิตโคโพลีเมอร์

นำหัวเชื้อจาก 2.4.2 ใส่ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อสูตรที่ 1 และ 2 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30° ซ เวลาเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่ศึกษาจาก 2.4.3 นำกล้าเชื้อที่ได้มาปั่นแยกเอาส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อออก โดยให้มีน้ำหนักเซลล์เปียก 0.4 กรัม/ขวด แล้วกระจายเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตโคโพลีเมอร์ (อาหาร MSM)

2.4.5 การคัดเลือกอาหารเลี้ยงหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเตรียมกล้าเชื้อ เพื่อให้มีประสิทธิภาพในขั้นตอนการผลิต (ขั้นตอนที่ 2)

นำหัวเชื้อจาก 2.4.2 ใส่ลงในอาหาร สำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อสูตรที่ 1 และ 2 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30° ซ เวลาที่เหมาะสมจาก 2.4.3 เตรียมหัวเชื้อสำหรับการผลิตตามข้อ 2.4.4 ถ่ายลงในอาหาร เพื่อการผลิตโคโพลีเมอร์หรืออาหาร MSM (อาหารที่แสดงในข้อ 2.3.3) แหล่งคาร์บอนที่ใช้คือ กรดวาเลอริก กรดบิวทิริกผสมกับโซเดียม4-ไฮดรอกบิวทิเรท (1:1 โดยน้ำหนัก)

กลีเซอรอล น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม ความเข้มข้น 20 กรัม/ลิตร ซึ่งเตรียมตามข้อ 2 ตัวอย่างที่เวลา 48 ชม. วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ปริมาณโคโพลิเมอร์ที่ผลิตได้

จากข้อ 2.4.3 ถึง 2.4.6 ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นและปริมาณหัวเชื้อ และชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงหัวเชื้อ เพื่อให้ได้กล้าเชื้อที่มีปริมาณมาก และมีประสิทธิภาพ (ขั้นตอนที่ 1) สำหรับนำไปถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต (ขั้นตอนที่ 2)

2.5 <u>การศึกษาความสามารถในการใช้กรดอินทรีย์ เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตโคโพลีเมอร์ ของ *Alcaligenes sp.* A-04 และคัดเลือกชนิดของกรดอินทรีย์ที่ให้การเติบโตดี และปริมาณโคโพลีเมอร์สูง</u>

นำกล้าเชื้อที่เตรียมได้ จากข้อ 2.4.4 ถ่ายลงในอาหาร MSM กรดอินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กรดวาเลอริก กรดบิวทิริก โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท กรดโพรพิโอนิก และ โซเดียมอะซิเตท เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30° ซ เวลา 48 ชม. นำตัวอย่างมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์ คัดเลือกชนิดของกรดอินทรีย์ที่ให้ปริมาณโคโพลีเมอร์สูงสุดและน้ำหนักเซลล์แห้งสูง เพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับขั้นตอนการปรับปรุง เพื่อเพิ่มปริมาณการสร้างโคโพลีเมอร์

2.6 <u>การหาเวลาที่เหมาะสมในการสร้างและสะสมโคโพลีเมอร์</u>

นำกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.4.4 ถ่ายลงในอาหาร MSM ที่มีกรดอินทรีย์ชนิดที่ได้ทำการคัดเลือกจาก 2.5 นำมาเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30° ซ เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชม. เป็นเวลา 72 ชม. นำตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสง น้ำหนักเซลล์แห้ง และ ปริมาณโคโพลีเมอร์ คัดเลือกเวลาที่เหมาะสมในการผลิตโคโพลีเมอร์สูงสุด

2.7 <u>การหาปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสมในการสร้าง และสะสมโคโพลีเมอร์</u>

นำกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.4.4 แปรผันปริมาณของน้ำหนักเซลล์เปียกเท่ากับ 0.2 0.4 0.6 และ 0.8 กรัม/ขวด โดยใช้กราฟเปรียบเทียบระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และน้ำหนักเซลล์เปียก (ภาคผนวกที่ 1ก) ถ่ายกล้าเชื้อลงในอาหาร MSM ที่มีกรดอินทรีย์ชนิดที่ได้ทำการคัดเลือกจาก2.5 นำมาเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 ° ซ เก็บที่เวลาที่ได้ทำการ

คัดเลือกในข้อ 2.6 นำตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสง น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์ คัดเลือกปริมาณกล้าเชื้อเหมาะสมที่ให้ปริมาณโคโพลีเมอร์สูงสุด

2.8 การปรับปรุงปริมาณสารอาหารหลักในอาหาร MSM เพื่อการสร้างโคโพลีเมอร์

ในการหาปริมาณสารอาหารไนโตรเจน ฟอสเฟต หรือแมกนีเซียมในปริมาณจำกัด และหาปริมาณคาร์บอนมากเกินพอซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่สมดุลย์สำหรับการเติบโต (imbalance growth) เพื่อกระตุ้นให้เซลล์มีการสะสมโคโพลีเมอร์เพิ่มขึ้น ทำโดยการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดทดลองขนาด 250 มล. ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มล. เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ โดยใช้เวลาในการเลี้ยงและปริมาณกล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 2.6 และ 2.7

2.8.1 การหาปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ

ในการหาปริมาณคาร์บอนมากเกินพอในอาหาร MSM สำหรับใช้ในการสร้างและสะสมโคโพลีเมอร์ของ *Alcaligenes* A-04 โดยใช้ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือกจาก 2.5 โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 4 10 20 24 30 40 และ 50 กรัม/ลิตร สารอาหารชนิดอื่นตามสูตรอาหาร MSM ที่แสดงในข้อ 2.3.3 นำตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ และปริมาณคาร์บอนที่เหลือ คัดเลือกความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอและให้ปริมาณโคโพลิเมอร์สูงสุด

2.8.2 การหาปริมาณแหล่งไนโตรเจนจำกัด

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือ แอมโมเนียมซัลเฟต โดยจะแปรผันความเข้มข้นเท่ากับ 0.05 0.1 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ชนิดแหล่งคาร์บอนที่ใช้ตามข้อ 2.5 ปริมาณแหล่งคาร์บอนตามข้อ 2.8.1 และสารอาหารชนิดอื่นตามสูตรอาหาร MSM ที่แสดงในข้อ 2.3.3 นำตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือ ในขั้นนี้จะได้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตจำกัดที่มีผลในเพิ่มการสร้างโคโพลีเมอร์ และทราบอัตราส่วน C/N ที่เหมาะสม

2.8.3 การหาปริมาณฟอสเฟตจำกัด

แหล่งฟอสเฟตที่ใช้คือ โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โดยจะแปรผันความเข้มข้นควบคู่กัน โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง KH_2PO_4 : Na_2HPO_4 ดังนี้คือ 0:0 0.10:0.03 0.50:0.15 1.00:0.30 2.00:0.60 3.00:0.90 และ 4.00:1.20 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ชนิดแหล่งคาร์บอนที่ใช้ตามข้อ 2.5 ปริมาณแหล่งคาร์บอนตามข้อ 2.8.1 ปริมาณแหล่งไนโตรเจนตามข้อ 2.8.2 และสารอาหารชนิดอื่นตามสูตรอาหาร MSM ที่แสดงในข้อ 2.3.3 นำตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์ การศึกษาขั้นนี้จะได้ปริมาณฟอสเฟตจำกัดที่มีผลในการเพิ่มการสร้างโคโพลีเมอร์

2.8.4 การหาปริมาณแมกนีเซียมจำกัด

แหล่งแมกนีเซียมที่ใช้คือ แมกนีเซียมซัลเฟต โดยจะแปรผันความเข้มข้นเท่ากับ 0 0.025 0.05 0.10 0.15 0.20 และ 0.30 กรัม/ลิตรตามลำดับ โดยใช้ชนิดแหล่งคาร์บอนตามข้อ 2.5 ปริมาณแหล่งคาร์บอนตามข้อ 2.8.1 ปริมาณแหล่งไนโตรเจนตามข้อ 2.8.2 ปริมาณแหล่งฟอสเฟตจาก 2.8.3 และสารอาหารชนิดอื่นตามสูตรอาหาร MSM ที่แสดงในข้อ 2.3.3 นำตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์ จากการศึกษาขั้นนี้จะได้ปริมาณแมกนีเซียมจำกัดที่เพิ่มการสร้างโคโพลีเมอร์

จากการวิจัยข้อ 2.8 นี้จะได้ปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ ปริมาณแหล่งไนโตรเจน (อัตราส่วน C/N) ปริมาณฟอสเฟต และปริมาณแมกนีเซียมจำกัดสำหรับใช้ในการเลี้ยงเชื้อในการผลิตโคโพลีเมอร์ต่อไป

2.9 <u>การเพิ่มปริมาณทวีคูณของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน โดยใช้อัตราส่วนเท่ากับ 20:0.1เพื่อเพิ่มการสร้างและสะสมโคโพลีเมอร์</u>

แปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน ซึ่งมีอัตราส่วนของคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 20:0.1 (จากข้อ 2.8.1 และ 2.8.2) โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 เท่า ตามลำดับ ปริมาณฟอสเฟต และปริมาณแมกนีเซียม ตามข้อ 2.8.3 และ 2.8.4 สารอาหารชนิดอื่นตามสูตรอาหาร MSM ที่แสดงในข้อ 2.3.3 นำตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร หาค่าน้ำหนักแห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์

2.10 การหาความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนเดี่ยวชนิดต่างๆ ของ *Alcaligenes sp.* A-04

หาความสามารถของ *Alcaligenes sp.* A-04 ในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เพื่อใช้ในการสร้างโคโพลีเมอร์ โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อและเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงตามข้อ 2.6 และ 2.7 ปริมาณแหล่งคาร์บอน 20 กรัม/ลิตร และปริมาณไนโตรเจน 0.1 กรัม/ลิตร จากข้อ 2.9 ปริมาณฟอสเฟต และปริมาณแมกนีเซียมตามข้อ 2.7.3 และ 2.7.4 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ ได้แก่

กรดอินทรีย์ เช่น กรดออกทาโนอิก กรดวาเลอริก กรดบิวทิริก โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท กรดโพรพิโอนิก และ โซเดียมอะซิเตท

แอลกอฮอล์ เช่น ออกทานอล บิวทานอล เอธานอล เมทธานอล

น้ำมันพืช เช่น น้ำมันปาล์ม น้ำมันข้าวโพด น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันถั่วเหลืองผสม น้ำมันเมล็ดฝ้าย น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน

โพลีไฮดรอกซี เช่น กลีเซอรอล แมนนิทอล ซอร์บิทอล

นำตัวอย่างมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์

2.11 การสร้างโคโพลีเมอร์ และเทอร์โพลีเมอร์สัดส่วนต่างๆ โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสม

2.11.1 การสร้างโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-3HV) สัดส่วนต่างๆ โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่าง กรดบิวทิริก และกรดวาเลอริก

เลี้ยงเชื้อตามข้อ 2.10 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดบิวทิริก และกรดวาเลอริก ในอัตราส่วนต่างๆกัน และให้ความเข้มข้นรวมเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร และแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร หลังจากการเลี้ยง นำตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณของโคโพลีเมอร์ และ สัดส่วนของโมโนเมอร์

2.11.2 การสร้างโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-3HV) สัดส่วนต่างๆ โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่าง ฟรุกโตส และ กรดวาเลอริก

เลี้ยงเชื้อตามข้อ 2.10 โดยใช้คาร์บอนผสมระหว่าง ฟรุกโตส และ กรดวาเลอริก ในอัตราส่วนต่างๆกัน และให้ความเข้มข้นรวมเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร และแหล่ง

ไนโตรเจนเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร หลังจากการเลี้ยงนำตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง หาปริมาณของโคโพลีเมอร์ และ สัดส่วนของโมโนเมอร์

2.11.3 การสร้างโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-4HB) สัดส่วนต่างๆ โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสม

เลี้ยงเชื้อตามข้อ 2.10 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่าง กรดบิวทิริก และ โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรทในอัตราส่วนต่างๆกัน โดยความเข้มข้นรวมเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร และแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร หลังจากการเลี้ยงนำตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณของโคโพลีเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์

2.11.4 การสร้างเทอร์โพลีเมอร์ P(3HB-4HB-3HV) สัดส่วนต่างๆ โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสม

เลี้ยงเชื้อตามข้อ 2.10 โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่าง กรดวาเลอริก กรดบิวทิริก และโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรทในอัตราส่วนต่างๆกัน โดยความเข้มข้นรวมเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร และแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร หลังจากการเลี้ยงนำตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณของโคโพลีเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์

2.12 <u>การเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เพื่อผลิตโคโพลีเมอร์ และเทอร์โพลีเมอร์ในถังหมัก 5 ลิตร โดยการเลี้ยงแบบ batch cultivation</u>

เนื่องจากต้องการปริมาณสารผลิตภัณฑ์มากจึงเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเตรียมกล้าเชื้อตามข้อ 2.4.4 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 12 กรัม(น้ำหนักเซลล์เปียก)/ ลิตร โดยแหล่งคาร์บอนคือกรดวาเลอริกเข้มข้น 20 กรัม/ลิตร แปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1.0 กรัม/ลิตร ควบคุม pH และเลี้ยงเชื้อสภาวะเช่นเดียวกับ ชนัญ ผลประไพ (2537) คืออุณหภูมิ 30 °ซ อัตราการกวน 600 รอบ/นาที อัตราการให้อากาศ 1.8 vvm

2.12.1 การสร้างและสะสมโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-3HV) ของ *Alcaligenes sp.* A-04

เตรียมกล้าเชื้อโดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อ และสภาวะการเลี้ยงตามข้อ 2.12 โดยใช้แหล่งคาร์บอนคือกรดวาเลอริก กรดวาเลอริกและกรดบิวทิริก หลังจากการเลี้ยงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร หาน้ำหนักเซลล์แห้ง หาปริมาณโคโพลีเมอร์ และชนิดของโมโนเมอร์

2.12.2 การสร้างและสะสมโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-4HB) ของ *Alcaligenes sp.* A-04

เตรียมกล้าเชื้อโดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อ และสภาวะการเลี้ยงตามข้อ 2.12 โดยใช้แหล่งคาร์บอนคือกรดบิวทิริก และโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท อัตราส่วน 3:1 หลังจากการเลี้ยงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร หาน้ำหนักเซลล์แห้ง หาปริมาณโคโพลีเมอร์ และชนิดของโมโนเมอร์

2.12.3 การสร้างและสะสมเทอร์โพลีเมอร์ P(3HB-4HB-3HV)ของ *Alcaligenes sp.* A-04

เตรียมกล้าเชื้อโดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อ และสภาวะการเลี้ยงตามข้อ 2.12 โดยใช้แหล่งคาร์บอนคือกรดวาเลอริก:กรดบิวทิริก:โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท เท่ากับ 10:20:30 หลังจากการเลี้ยงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร หาน้ำหนักเซลล์แห้ง หาปริมาณโคโพลีเมอร์ และชนิดของโมโนเมอร์

2.13 <u>การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของโคโพลีเมอร์โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี</u>

โดยวิธี Comean และคณะ (1988) ปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักโดยปั่นที่ 5,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น นำเซลล์มาละลายในน้ำกลั่น 10 มล. เทใส่ขวดรูปชมพูขนาด 250 มล. นำไปทำให้แห้งภายใต้สูญญากาศ ชั่งเซลล์แห้ง 20 มก. ใส่หลอดฝาเกลียว เติมคลอโรฟอร์ม 2 มล. เติมเมทธานอลที่มีกรดซัลฟุริกเข้มข้น 3 % โดยปริมาตร 2 มล. ซึ่งมีกรดเบนโซอิกเป็นสารละลายมาตรฐานภายในปริมาณ 2,000 ไมโครกรัม นำไปอุ่นที่ 80 °ซ นาน 3.5 ชั่วโมง (ควรเขย่าเป็นครั้งคราว) เติมน้ำกลั่น 1 มล. เขย่าอย่างแรงนาน 5 นาที และปั่นที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบ/นาที นาน 3 นาที ดูดชั้นน้ำที่มีกากเซลล์และกรดปนอยู่ทิ้ง เก็บชั้นคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง)

ซึ่งมีอนุพันธ์เมทธิลเอสเทอร์ของโมโนเมอร์ นำไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของโมโนเมอร์โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี สำหรับสารมาตรฐานเตรียมโดยวิธีเดียวกัน

คอลัมน์ : แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด FFAP เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มม. ยาว 25 ม.

สภาวะ : split ratio 50:1

Flame ionization detector temperature 250 °ซ

Injection temperature 250 °ซ

Column temperature 150 °ซ

Isothermal temperature

carrier gas (He)

การวิเคราะห์ชนิดของโมโนเมอร์โดยการเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) กับเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารมาตรฐาน P(3HB-co-24% 3HV) โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิริก โซเดียม-3-ไฮดรอกซีบิวทิริก (ภาคผนวก 6ก 6ข และ 6ค)

การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ของ 3HB 3HV และ 4HB (% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ซึ่งคำนวณโดยใช้กราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก 5ก 5ข และ 5ค) เช่น

$$\text{ปริมาณ 3HB} = \frac{\text{พ.ท. ใต้พีกของ 3HB}}{\text{พ.ท.ใต้พีกของกรดเบนโซอิก}} \times \text{ความชันกราฟของ 3HB} \times \frac{10^{-6} \times 100}{20 \times 1.1 \times 10^{-3}}$$

หมายเหตุ : 1.10 คือ corretion factor ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งโดยการอบต่อน้ำหนักเซลล์แห้งภายใต้สูญญากาศ (cell dry weight = lyophilized weightx1.10)

การคำนวณสัดส่วนองค์ประกอบในโคโพลีเมอร์ (mole fractor) ทำได้โดย

1 คำนวณหาปริมาณของแต่ละโมโนเมอร์จากสมการที่กล่าวมา

2 คำนวณหาจำนวนโมลของแต่ละโมโนเมอร์โดยการหารด้วยน้ำหนักโมเลกุล (น้ำหนักโมเลกุลของ 3HB 4HB และ3HV = 86 86 และ 100 ตามลำดับ)

3 คำนวณหา mole fraction (โมล %)

$$\text{mole fraction ของ 3HB (โมล \%)} = \frac{\text{จำนวนโมลของ 3HB} \times 100}{\text{ผลรวมของจำนวนโมลของโมโนเมอร์}}$$

โมโนเมอร์ชนิดอื่นคำนวณในทำนองเดียวกัน

2.14 การวิเคราะห์ปริมาณกรดวาเลอริกที่เหลือโดย HPLC

นำน้ำหมักจากข้อ 2.1.1 มาปั่นแยกเซลล์ที่ 5,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เก็บส่วนน้ำหมักมาทำการเจือจาง นำส่วนน้ำใสไปกรองผ่านกระดาษกรอง 0.45 ไมครอน นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPCL เปรียบเทียบหาปริมาณกับกราฟมาตรฐานหากรดวาเลอริก (ภาคผนวกที่ 3) เปรียบเทียบโครมาโตรแกรมของกรดวาเลอริกมาตรฐาน กับ กรดวาเลอริกในน้ำหมัก (ภาคผนวกที่ 3ก)

คอลัมน์ : Zorbax C_8

สภาวะ : UV detector 218 nm

: Mobile phase 20 mM H_3PO_4 PH 2.5

: Injection volume 5 ไมโครลิตร

: Room temperature

2.15 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก

ใช้วิธีของ Kemper (1974) โดยนำน้ำหมักที่แยกเซลล์ออกแล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม (มีความเข้มข้นของไนโตรเจนแอมโมเนียมระหว่าง 0.5-12 ไมโครกรัม/มล.) เติมสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์ 3 มล. (ภาคผนวกที่ 4) เติมสารละลาย EDTA (ภาคผนวกที่ 4) 1 มล. ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 1 นาที ต่อมาเติมฟินอลไนโตรพัสซายด์รีเอเจนท์ (ภาคผนวกที่ 4) 2 มล. เติมบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรท์รีเอเจนต์ (ภาคผนวกที่ 4) 4 มล. และเติมน้ำปลอดประจุจนเป็น 25 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 40 °ซ ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร คำนวณปริมาณไนโตรเจนแอมโมเนียม (NH_4^+-N) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 4ก)

ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (มก./มล.) = OD_{636} x ความชัน x ค่าการเจือจาง x $\frac{132}{28 \times 10^3}$

หมายเหตุ 132 คือ น้ำหนักโมเลกุลของแอมโมเนียมซัลเฟต

28 คือ น้ำหนักโมเลกุลของธาตุไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟต

2.16 วิธีการสกัดแยกและทำให้สารผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์

โดยวิธีของอรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) นำน้ำหมักที่ได้จากข้อ 2.12.2

ปั่นแยกที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที เก็บส่วนของเซลล์ไว้ นำเซลล์มาบ่มในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ หรือคลอรอกซ์ ปั่นที่ความเร็วเท่าเดิมเพื่อเก็บตะกอนล้างด้วยอะซีโตน ล้างด้วยเอทธานอลบริสุทธิ์ 99.8 % เก็บส่วนตะกอนไว้แบ่งใส่หลอดฝาเกลียว เติมคลอโรฟอร์มหลอดละ 10 มล. แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 80 °ซ 2 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปปั่นเก็บส่วนใสไว้ นำส่วนตะกอนไปสกัดแยกด้วยคลอโรฟอร์มอีกครั้ง รวมส่วนคลอโรฟอร์มใสที่ได้กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำไประเหยออกที่อุณหภูมิ 80 °ซ เพื่อทำให้ตัวอย่างมีความเข้มข้นมากขึ้น จากนั้นนำมาตกตะกอนด้วยเมทธานอล (ใช้ปริมาตร 10 เท่าของสารละลายในคลอโรฟอร์ม) ปั่นแยกตะกอนสารผลิตภัณฑ์ที่ 3,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที นำตะกอนมาละลายด้วยคลอโรฟอร์มและตกตะกอนซ้ำอีก 2 ครั้งด้วยเมทธานอลและไดเอธิลอีเทอร์ นำส่วนตะกอนมาอบแห้งที่ 80 °ซนาน 12 ชม. นำตะกอนของสารผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ แล้วมาละลายด้วยคลอโรฟอร์ม และเทใส่แบบที่ได้เตรียมไว้แบบที่ใช้ในการหล่อแผ่นฟิลม์ คือแผ่นกระจกซึ่งมีกระจกสไลด์ติดเป็นขอบอยู่ด้านบน

2.17 <u>การตรวจโครงสร้างโมเลกุลโดยเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์</u>

นำแผ่นฟิล์มจากข้อ 2.16 มาละลายด้วยคลอโรฟอร์ม แล้วหยดลงแผ่นซิลเวอร์คลอไรด์เกลี่ยให้ทั่วแผ่นทิ้งให้แห้ง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงอินฟาเรดที่ช่วงคลื่น 400 ถึง 4000 cm^{-1}

2.18 <u>การตรวจโครงสร้างโมเลกุลโดยเครื่อง NMR</u>

นำแผ่นฟิล์มจากข้อ 2.16 ไปวัด ^{1}H-NMR ที่ความถี่ 500 MHz และ ^{13}C-NMR ที่ความถี่ 125 MHz โดยใช้ $CDCl_3$ (deuterated chloroform) เป็นตัวทำละลาย และ TMS (tetramethylsilane) เป็นสารมาตรฐานภายใน

2.19 <u>การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารผลิตภัณฑ์</u>

2.19.1 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี Gel permeation chrometography (GPC)

นำแผ่นฟิล์มจากข้อ 2.16 หนักเท่ากับ 0.0200 กรัม นำมาละลายด้วยเตตระไฮโดรฟูแรน (TMF) ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มล. กรองตัวอย่างผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน เก็บใน vial ปริมาณที่ฉีดเข้าเครื่องเท่ากับ 0.1 มล. โดยใช้ THF เป็น mobile phase เครื่องจะคำนวณค่าน้ำหนักโมเลกุลให้

2.19.2 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี viscometry

นำแผ่นฟิลม์จากข้อ 2.16 และ P(3HB-24%3HV) มาตรฐานมาละลายด้วยคลอโรฟอร์มให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.2 ถึง 0.8 กรัมต่อ 100 มล. นำมา 25 มล. ใส่ลงในคอลัมน์ของเครื่อง viscometer แบบ Ubbelohde tube ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.05 ซม. (ASTM D.445 No 1828) ใช้นาฬิกาจับเวลาที่สารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ และตัวทำละลายเคลื่อนที่ผ่านเส้นกำหนดตำแหน่ง (marker) บนคอลัมน์ ซึ่งควบคุมอุณหภูมิโดยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °ซ นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า intrinsic viscosity ([n]) (ภาคผนวกที่ 7)

2.20 <u>การวิเคราะห์อุณหภูมิหลอมเหลว (Tm)และ glass transition temperature (Tg)</u>

นำสารผลิตภัณฑ์จากข้อ 3.11.2 P(3HB-97% 3HV) P(48% 3HB-39% 3HV-13% 4HB) P(3HB) และสารมาตราฐาน P(3HB-14% 3HV) วิเคราะห์ Tm และ Tg โดยวิธี Differential scanning calorimetry โดย calibrate ที่ scan rate เท่ากับ 10 °ซ/นาที ภายใต้สภาวะของกาซฮีเลียม และใช้ Indium กับ cyclohexane เป็นสารมาตรฐานในการcalibrate วิเคราะห์หา Tm และ Tg ของสารผลิตภัณฑ์โดยเริ่มจากอุณหภูมิ -80 °ซ และเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 10 °ซ/นาที ถึง 200 °ซ

2.21 <u>การวิเคราะห์สมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มโดยเครื่อง Universal testing machine</u>

นำแผ่นฟิลม์จากข้อ 2.16 มาเตรียม specimens ตามวิธีมาตรฐานของ ASTM (D 882-91) specimens มีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า ยาว 150 มม. กว้าง 5 มม ช่วงทดสอบยาว 100 มม. และที่เหลือเป็นช่วงยึด ด้านละ 25 มม. (ภาคผนวกที่ 8) ดึง specimen ด้วยอัตรา 10 มม./นาที จนกระทั่ง specimen ขาด แต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ สมบัติเชิงกลที่วิเคราะห์ คือ Tensile strenght หรือ Stress at peak Load atpeak Displacement at peak (ระยะที่พลาสติกยืด) Young's Modulus Toughness % Elongation นำข้อมูลมาเปรียบเทียบกับ specimen ของ PP และ PE ที่ทดสอบโดยวิธีเดียวกัน