บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

อุปกรณ์

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องเขย่า (shaker) แบบโรตารี่	G-10	New Brunswick Scientific Co.Ltd, USA.
เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)	KS-3000P	Kubota, Japan
เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge)	J2-21	Beckman, USA.
เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance)	L2200P	Sartorius, Germany
เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance)	A200S	Sartorius, Germany
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer)	UV-160A	Shimadzu, Japan
เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	240	Corning, USA.
ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow	BV-124	ISSCO, USA.
ตู้อบ (oven)	UL 60	Memmert, Germany
หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave)	HA-36	Hirayama Manufacturing Corporation, Japan
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	W760	Memmert, Germany
เครื่องปั่นผสม (vortex mixer)	G-560E	Scientific Industrial Inc., USA.
เตาไฟฟ้า (stirring hot plate)	DS 201HS	DMS, Japan

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
ถังหมัก (fermentor) ขนาด 5 ลิตร และชุดควบคุมสภาวะ	MD300	L.E. Marubishi Co.Ltd., Japan
เครื่องทำระเหิดแห้งแบบสุญญากาศ (lyophilizer)	Eyela FD-1	Tokyo Rikakikai Co.Ltd., Japan
เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (gas chromatography) วิเคราะห์ข้อมูลโดยคอมพิวเตอร์และโปรแกรมสำเร็จรูป Star Chromatogram Version 4.0	3400CX	Variance, USA
แคปพิลลารีคอลัมน์ชนิด cabowax-PEG ขนาด 60 ม.× 25 มม.× 25 ไมครอน		Restex, USA.
เครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ (autosampler)	8200CX	Variance, USA.
เครื่องผลิตก๊าซไฮโดรเจน (hydrogen generator)	9200	Packard, USA.
เครื่องผลิตอากาศ (air compressor)	WL5050000AJ	Campbell Hausfeld, USA.
เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography : HPLC)	LC-3A	Shimadzu, Japan
เครื่องวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล (gel permeation chromatography : GPC)	600E	Waters, USA
คอลัมน์ชนิด ultrastyragel ขนาด 10^4 และ 10^3 อังสตรอม		Waters, USA
เครื่องวิเคราะห์จุดหลอมเหลว (differential scanning calorimeter : DSC)	DSC200	NETZSCH, Germany
crusible pan & cover (Al 25 μl)	100 DSC	NETZSCH, Germany
เครื่องวัดคุณสมบัติเชิงกลของพลาสติก (universal testing machine) automated materials testing system	IX	Instron, USA.
เครื่องวัดความหนาของแผ่นฟิล์ม	7301	Mitutoyo, Japan
เครื่องวัดระดับระนาบ	Jack No. P-20	Magnet, Germany

เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
กรดวาเลอริก ($C_5H_{10}O_2$)	Sigma Chemical, USA.
กรดบิวทีริก ($CH_3CH_2CH_2COOH$)	E. Merck Damstadt, Germany
กรดเบนโซอิก (C_6H_5COOH)	Nacalai Tesque Inc., Japan
โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทีเรต ($CH_3CH(OH)CH_2COONa$)	Wako Pure Chemical Industries, Japan
โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทีเรต($C_4H_7O_3Na$)	Sigma Chemical, USA.
โพลี(3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต-20%-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต	Aldrich Chemical Company Inc., USA.
สารมาตรฐานพอลิสไตรีนน้ำหนักโมเลกุล 3,840,000	Tosoh, Japan
สารมาตรฐานพอลิสไตรีนน้ำหนักโมเลกุล 2,890,000	Tosoh, Japan
สารมาตรฐานพอลิสไตรีนน้ำหนักโมเลกุล 1,090,000	Tosoh, Japan
สารมาตรฐานพอลิสไตรีนน้ำหนักโมเลกุล 706,000	Tosoh, Japan
สารมาตรฐานพอลิสไตรีนน้ำหนักโมเลกุล 355,000	Tosoh, Japan
สารมาตรฐานพอลิสไตรีนน้ำหนักโมเลกุล 96,400	Tosoh, Japan
สารมาตรฐานพอลิสไตรีนน้ำหนักโมเลกุล 37,900	Tosoh, Japan
สารมาตรฐานพอลิสไตรีนน้ำหนักโมเลกุล 9,100	Tosoh, Japan
ไดเอทธิลอีเทอร์	E. Merck Damstadt, Germany
คลอโรฟอร์ม	E. Merck Damstadt, Germany และ J.T. Baker, USA.
อะซิโตน	BHD Laboratory, England
เมทธานอล	E. Merck Damstadt, Germany
เอทธานอล	E. Merck Damstadt, Germany

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
เฮกเซน	AJAX Chemicals, Australia
ไดคลอโรมีเทน	E. Merck Damstadt, Germany
กรดซัลฟูริกเข้มข้น	E. Merck Damstadt, Germany
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	May & Baker Laboratory Chemical, England
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	Riedel-de Heanag Speelze, England
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	E. Merck Damstadt, Germany
โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	Carlo Erba, Italy
แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต ($(NH_4)_6Mo_7.4H_2O$)	J.T. Baker, USA
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	Carlo Erba, Italy
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	E. Merck Damstadt, Germany
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	E. Merck Damstadt, Germany
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	May & Baker Laboratory Chemical, England
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	E. Merck Damstadt, Germany
กรดบอริก (H_3BO_3)	E. Merck Damstadt, Germany
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)	Carlo Erba, Italy
โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl)	Chlorox company, USA.

สารอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ (culture media) เช่น ผงสกัดจากยีสต์ สารสกัดจากเนื้อ และเปปโตน เป็นของบริษัท Difco, USA. และพอลิเปปโตน เป็นของบริษัท Becton Dickinson, USA.

ถุงพลาสติกที่ผลิตจาก PP และ PE จากร้านค้าทั่วไป

จุลินทรีย์

Alcaligenes sp. A-04 เป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้โดยอรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) ซึ่งสามารถสร้างและสะสมพอลิบีตาไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (PHA)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1) สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (stock culture medium) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม

ปรับให้มีค่าพีเอชเป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 ^{0}ซ. เป็นเวลา 15 นาที (การนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน)

2) สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed culture medium) โดย Doi และคณะ (1986) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

ผงสกัดจากยีสต์	10	กรัม
พอลิเปปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม

ปรับให้มีค่าพีเอชเป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

3) สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต PHA ได้แก่ mineral salt medium (MSM) ซึ่งเป็นสูตรปรับปรุงโดยอรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

แหล่งคาร์บอน	20.00	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$	1.00	กรัม
โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (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
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต $(CaCl_2.2H_2O)$	20.00	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต $(ZnSO_4.7H_2O)$	1.30	มก.
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต $(FeSO_4.7H_2O)$	0.20	มก.
แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0.60	มก.
กรดบอริก (H_3BO_3)	0.60	มก.

แยกละลาย trace elements แล้วจึงนำมารวมกับสารละลายเกลือ และผงสกัดจากยีสต์ ชั่งแหล่งคาร์บอนและตวง MSM 50 มล. ใส่ในขวดทดลองขนาด 250 มล. ปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 และ 4 โมลาร์ นำมานึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

วิธีเก็บรักษาเชื้อและการเตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงเป็นกล้าเชื้อ (inoculum)

1) การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ (streak) โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) สำหรับเก็บรักษาเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเติบโตดีแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ นำมาเขี่ยลากเชื้อลงบนอาหารใหม่ (subculture) ทุก ๆ 1 เดือน

2) การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงเป็นกล้าเชื้อ

นำเชื้อที่เก็บรักษาไว้มาเขี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็งเอียงใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 24 ชม. ทำการกระจาย (suspend) เชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ นำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.35-0.40 ถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 1 มล. (2% ต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้า

เชื้อปริมาตร 50 มล. ทำการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชม.

การเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 เพื่อเพิ่มปริมาณ PHA ในถังหมัก 5 ลิตร โดยการเลี้ยงแบบ batch cultivation

เนื่องจากต้องการปริมาณสารผลิตภัณฑ์มากเพื่อนำมาทดสอบสมบัติด้านต่างๆ จึงเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยการเตรียมกล้าเชื้อที่มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 12 กรัม (น้ำหนักเซลล์เปียก) ต่อลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมคือกรดวาเลอริก กรดบิวทีริก และโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทีเรตปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร โดยควบคุมภาวะการเลี้ยงเชื้อตามรายงานของ ชนัญ ผลประไพ (2537) คืออุณหภูมิ 30 °ซ. อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.8 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ที่พีเอช 7.0

1) การสร้างและสะสมโฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) ของ *Alcaligenes* sp. A-04

เตรียมกล้าเชื้อปริมาณเริ่มต้น 12 กรัม(น้ำหนักเซลล์เปียก)ต่อลิตรเพื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต PHA โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกรดวาเลอริก ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 60 ชม. แล้วเก็บเซลล์ทั้งหมดมาสกัด PHA

2) การสร้างและสะสมโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) ของ *Alcaligenes* sp. A-04

เตรียมกล้าเชื้อปริมาณเริ่มต้น 12 กรัม(น้ำหนักเซลล์เปียก)ต่อลิตรเพื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต PHA โดยใช้แหล่งคาร์บอนคือ กรดวาเลอริกและกรดบิวทีริก ในอัตราส่วน 3 : 2 ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 60 ชม. เก็บเซลล์ทั้งหมดมาสกัด PHA

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

เตรียมกล้าเชื้อปริมาณเริ่มต้น 12 กรัม(น้ำหนักเซลล์เปียก)ต่อลิตรเพื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต PHA โดยใช้แหล่งคาร์บอนคือ กรดบิวทีริก และ โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทีเรต ในอัตราส่วน 3 : 1 ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 60 ชม. แล้วเก็บเซลล์ทั้งหมดมาสกัด PHA

4) การสร้างและสะสมเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-4HB-co-3HV) ของ *Alcaligenes* sp. A-04

เตรียมกล้าเชื้อปริมาณเริ่มต้น 12 กรัม(น้ำหนักเซลล์เปียก)ต่อลิตรเพื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต PHA โดยใช้แหล่งคาร์บอนคือ กรดวาเลอริก : กรดบิวทีริก : โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทีเรต เท่ากับ 1 : 2 : 2 ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 60 ชม. แล้วเก็บเซลล์ทั้งหมดมาสกัด PHA

การสกัดแยก PHA และการทำให้บริสุทธิ์

นำน้ำหมักที่ได้มาปั่นแยกที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนของเซลล์ทั้งหมดไว้ ทำให้เซลล์แตกด้วยการบ่มในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์หรือคลอรอกซ์ เป็นเวลา 1 ชม. แล้วปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วเท่าเดิม เก็บตะกอนของเซลล์มาล้างด้วยอะซิโตน และเอทธานอล แล้วสกัดแยก PHA ด้วยคลอโรฟอร์มร้อน ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปปั่นและเก็บส่วนใสไว้ นำส่วนตะกอนไปสกัดแยกด้วยคลอโรฟอร์มอีกครั้ง รวมส่วนคลอโรฟอร์มใสที่ได้กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 หลังจากนั้นนำไประเหยแห้งที่อุณหภูมิ 80 °ซ เพื่อทำให้ตัวอย่างมีความเข้มข้นมากขึ้น แล้วนำมาตกตะกอนด้วยไดเอทธิลอีเทอร์และเมทธานอล 2 ครั้ง (โดยใช้ปริมาตร 10 เท่าของสารละลายในคลอโรฟอร์ม) ทำการปั่นแยกและเก็บตะกอนที่ได้มาอบให้แห้งที่ 80 °ซ และเก็บไว้ทำการทดลองต่อไป ซึ่งวิธีการสกัดแยกและการทำให้ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์นี้ตามวิธีการของ Brivonese และ Sutherland (1989) ซึ่งปรับปรุงโดยอรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536)

การวิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบของพอลิเมอร์โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี

ตามวิธีการของ Comeau และคณะ (1988) โดยทำการปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์มากระจายในน้ำกลั่น 10 มล. เทใส่ขวดทดลองขนาด 250 มล. นำไประเหิดแห้งภายใต้สุญญากาศ ชั่งเซลล์แห้ง 20 มก.ใส่หลอดฝาเกลียว เติมคลอโรฟอร์ม 2 มล. เติมเมทธานอลที่มีกรดซัลฟูริกเข้มข้น 3 % โดยปริมาตร 2 มล. ซึ่งมีกรดเบนโซอิกเป็นสารละลายมาตรฐานภายในปริมาณ 2,000 ไมโครกรัม นำไปอุ่นที่ 80 °ซ. นาน 3.5 ชั่วโมง (เขย่าเป็นครั้งคราว) เติมน้ำกลั่น 1 มล. เขย่าอย่างแรงนาน 5 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ดูดชั้นน้ำ (ชั้นบน) ที่มี

กากเซลล์และกรดปนอยู่ทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง เก็บชั้นคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) ซึ่งมีอนุพันธ์เมทธิลเอสเทอร์ของโมโนเมอร์ละลายอยู่ สำหรับสารมาตรฐานเตรียมโดยวิธีเดียวกัน นำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของโมโนเมอร์โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี ซึ่งมีภาวะดังนี้

คอลัมน์	: แคปพิลลารีคอลัมน์ชนิด Cabowax-PEG ขนาด 60 ม. × 25 มม. × 25 ไมครอน
อุณหภูมิของคอลัมน์	: 130 °ซ นาน 4 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 200 °ซ ด้วยอัตรา 15°ซ ต่อนาที รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 200 °ซ นาน 6.4 นาที
อุณหภูมิของ injector	: 250 °ซ (isothermal)
อุณหภูมิของ detector (FID)	: 250 °ซ (isothermal)
split ratio	: 50 ต่อ 1
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	: ฮีเลียม (He) ที่อัตราการไหล 2 มล.ต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	: 1 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์ชนิดของโมโนเมอร์โดยการเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) กับเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารมาตรฐาน P(3HB-co-20%3HV) โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทีริก และโซเดียม-3-ไฮดรอกซีบิวทีริก (ภาคผนวก ค)

การเตรียมตัวอย่างพอลิเมอร์เพื่อทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ

ชั่ง PHA บริสุทธิ์ที่มีองค์ประกอบต่างๆกันมาชนิดละ 0.1 กรัมละลายในคลอโรฟอร์มร้อนปริมาตร 10 มล. นำมาเทในถาดแก้วพื้นเรียบที่ตั้งอยู่ในระดับตรง ตั้งทิ้งไว้ให้คลอโรฟอร์มระเหยที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์เพื่อให้พอลิเมอร์มีความคงตัวโดยสม่ำเสมอทั่วแผ่น นำมาตัดเป็นแผ่นขนาด 1 ซม. × 1 ซม. × 0.05 มม. สำหรับทำการทดสอบการย่อยสลายด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสารละลายบัฟเฟอร์ปลอดเชื้อ และขนาด 1 ซม. × 2 ซม. × 0.05 มม. สำหรับการย่อยสลายทางชีวภาพในดิน โดยใช้แผ่นฟิล์มต่างๆ กัน 4 ชนิด ได้แก่ โฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) โคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) และ P(3HB-co-4HB) เทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB)

การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

โดยทำการบ่มชิ้นตัวอย่างพอลิเมอร์ชนิดต่างๆที่ผ่านการฆ่าเชื้อในสารละลายเอทธานอลเข้มข้น 70% แล้ว ด้วยวิธีปลอดเชื้อในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 10 มล. ในหลอดทดลองที่มีจุกยางปิด ทำการบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน 3 อุณหภูมิคือ 30 40 และ 55 °ซ เก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลา 280 วัน (ประมาณ 9 เดือน) โดยเก็บชิ้นตัวอย่างมาล้างในสารละลายเอทธานอลเข้มข้น 70% กรองด้วยกระดาษกรองและอบแห้งที่ 60 °ซ เก็บไว้ในตู้ดูดความชื้นเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพในดิน

โดยทำการบ่มชิ้นตัวอย่างพอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อในสารละลายเอทธานอลเข้มข้น 70% แล้ว ในแหล่งจุลินทรีย์ต่างกัน 5 ชนิดคือ ดินจากการย่อยสลายขยะแล้วนำมาปลูกต้นไม้ ดินจากการเผาขยะพลาสติก ปุ๋ยคอก ดินปลูก(ดินสีดา) และกากตะกอนจากการบำบัดน้ำเสีย ทำการศึกษาที่อุณหภูมิต่างกัน 3 อุณหภูมิคือ 30 40 และ 55 °ซ ภายใต้ภาวะที่มีอากาศและควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ในช่วง 30-80% ทำการเก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลา 245 วัน (ประมาณ 8 เดือน) นำชิ้นตัวอย่างที่เก็บได้มาล้างในสารละลายเอทธานอลเข้มข้น 70% กรองและอบแห้งที่ 60 °ซ และเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้นเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

การตรวจสอบลักษณะที่เปลี่ยนแปลงก่อนและหลังการย่อยสลายทางชีวภาพ

1) การหาน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงภายหลังการย่อยสลายทางชีวภาพ โดยการคำนวณน้ำหนักแห้งที่หายไป (dry weight loss) เทียบกับเวลา ตามสูตร

$$\text{dry weight loss (W)} = \frac{\text{initial dry weight } (W_o) - \text{dry weight at time t } (W_t)}{\text{initial dry weight } (W_o)}$$

$$\text{อัตราการผุพัง } (k_e) = W/t$$

2) การหาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์

ชั่งแผ่นฟิล์มที่เก็บที่ระยะเวลาต่างๆ ภายหลังการย่อยสลายทางชีวภาพมา 0.05 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์มในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มล. กรองตัวอย่างผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน เก็บในขวดตัวอย่างเล็ก (vial) นำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง GPC และใช้คลอโรฟอร์มเกรด HPLC เป็น mobile phase โดยมีพอลิสไตรีน (F1-F380) เป็นสารมาตรฐาน

detector	:	RI differential refractometer
คอลัมน์	:	ultrastyragel ขนาด 10^4 ต่อด้วย 10^3 อังสตรอม
อุณหภูมิ	:	อุณหภูมิห้อง
สารละลายตัวพา	:	คลอโรฟอร์มชนิดเกรด HPLC ที่อัตราการชะ 1 มล.ต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	:	60 ไมโครลิตร

คำนวณน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของพอลิสไตรีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 9,100-3,840,000 ซึ่งทำการวิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน (ภาคผนวก ง)

3) การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพที่เปลี่ยนแปลงของพอลิเมอร์

โดยชั่งแผ่นฟิล์มที่เก็บที่ระยะเวลาต่างๆ ภายหลังการย่อยสลายทางชีวภาพมา 5-10 มก. ใส่ในครูสิเบิล (crusible) นำไปวิเคราะห์หาอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) รวมทั้งค่าเอ็นทัลปีของการหลอมเหลว (Δh_f) ด้วยเครื่อง DSC

ภาวะ : ช่วงอุณหภูมิที่ใช้ -80 ถึง 200 ^{o}ซ ที่อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 10 ^{o}ซต่อนาที ภายใต้ภาวะของก๊าซฮีเลียม โดยมีก๊าซไนโตรเจนเหลวเป็นตัวลดอุณหภูมิ

4) ลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวพอลิเมอร์

โดยการนำแผ่นฟิล์มตัวอย่างซึ่งเก็บที่ระยะเวลาต่างกันจากการทดลอง มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) เพื่อดูลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์ม และลักษณะการผุพัง (erosion) ที่เกิดขึ้นจากการถูกย่อยสลายทางชีวภาพเปรียบเทียบที่เวลาต่างกัน