บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

2.1.1 อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CHK	Olympus Optical, Taiwan
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psychrotherm incubater shaker) รุ่น G-27 แบบ rotary	New Brunswick Scientific, U.S.A.
เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KS-3000P	Kubota, Japan
เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น L2200P	Sartorius, Germany
เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่นS2000B	Beckman, U.S.A.
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer) รุ่นUV-160	Shimadsu, Japan
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Novaspec II รุ่น 80-2088-64	Pharmacia, England
เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 1000	Eutech Cybermetics, U.S.A.
ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-240	ISSCO, U.S.A.
ตู้อบแห้ง (hot air oven)	Herson, England
ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (incubator)	Mermert, Germany
หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น Tomy SS-325	SEIKO, Japan
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	Memert, Germany
เตาให้ความร้อน (stirring hot plate)	DMS, Japan

2.1.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
กรดโพรพิโอนิก ($C_3H_6O_2$)	BDH, England
กรดบิวทีริก ($C_4H_8O_2$)	J.T.Baker, England
กรดกลูโคนิก ($C_6H_{12}O_7$)	Sigma Chemical,U.S.A.
กรดซัลฟุริกเข้มข้น (H_2SO_4)	E. Merk Damstadt,Germany
โซเดียมอะซิเตต ($C_2H_3O_2Na$)	E. Merk Damstadt,Germany
ฟรักโทส (analytical grade)	Fulka, Germany
ฟรักโทส (food grade)	รามาโพรดักส์, ไทย
แอมโมเนียมซัลเฟต{$(NH_4)_2SO_4$}	E. Merk Damstadt,Germany
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($Na_2HPO_4.2H_2O$)	E. Merk Damstadt,Germany
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	E. Merk Damstadt,Germany
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	E. Merk Damstadt,Germany
แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต {$(NH_4)M_7O_{24}.4H_2O$}	J.T. Baker, U.S.A.
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	E. Merk Damstadt,Germany
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	E. Merk Damstadt,Germany
โซเดียมไฮโปคลอไรท์	
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	E. Merk Damstadt,Germany
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	E. Merk Damstadt,Germany
กรดบอริก (H_3BO_3)	E. Merk Damstadt,Germany
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	May & Baker, U.S.A.
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)	Carlo erba, Italy
เมทธานอล	BDH laboratory, England
เอทธานอล	BDH laboratory, England
อะซิโตน	BDH laboratory, England

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
คลอโรฟอร์ม	BDH laboratory, England
L-glutamine	Sigma , U.S.A.
L-glutamic	Sigma , U.S.A.
L-asparagine	Sigma , U.S.A.
L-aspartic	Sigma , U.S.A.
L-proline	Sigma , U.S.A.
L-threonine	Sigma , U.S.A.
L-lysine	Sigma , U.S.A.
L-cystaine	Sigma , U.S.A.
L-arginine	Merck ,Germany
L-methionine	Sigma , U.S.A.
L-isoleucine	Sigma , U.S.A.
L-leucine	Sigma , U.S.A.
กรดโอเลอิก	ศรีจันทร์สหโอสถ จำกัด, ไทย
โซเดียมกลูโคเนต	BDH Chemicals, England
น้ำตาลฟรักโตส	
เคมีภัณฑ์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ	
สารสกัดจากเนื้อ	Difco, U.S.A.
สารสกัดจากยีสต์	สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและ วิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย
พอลิเปปโตน	Becton Dickinson, U.S.A.
เปปโตน	Difco, U.S.A.

2.2. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้คือ *Alcaligenes sp.* A-04 สามารถสร้างและสะสมPHB ซึ่งแยกและคัดเลือกโดยอรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536)

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ(stock culture medium) ใน 1 ลิตรประกอบด้วย

สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที(การนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน)

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

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

ปรับพีเอชเป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน แยกละลายฟรักโตส นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110°ซ เป็นเวลา 10 นาที

2.3.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตPHB

MSM(Mineral Salt Medium) สูตรปรับปรุงโดยอรุณ ชาญชัยเชาวีวัฒน์(2536) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

แอมโมเนียมซัลเฟต	0.1	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.3	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.05	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	0.1	กรัม
น้ำตาลฟรักโตส	20	กรัม
สารละลายเกลือแร่	1.0	มิลลิลิตร

สารละลายเกลือแร่ ใน 1 โมลาร์HCl ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แคลเซียมคลอไรด์	20	กรัม

ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	1.3	กรัม
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดต	0.6	กรัม
กรดบอริก	0.6	กรัม

แยกละลายส่วนของสารละลายเกลือแร่ แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต และสารสกัดจากยีสต์ เมื่อละลายแล้วจึงนำมารวมกันและเติมสารละลายเกลือแร่ 1 มิลลิลิตร และเติมกรดอะมิโน กรดอินทรีย์ และกรดไขมันแต่ละชนิดตามความเข้มข้นที่ต้องการศึกษา ปรับพีเอชเป็น 7.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3 โมลาร์ นึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน ส่วน L-cystaine L-aspartic acid และ L-glutamic acid นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธีการกรองด้วยกระดาษกรองมิลลิพอร์ (millipore filter)

แยกละลายน้ำตาลฟรักโตส นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110°ซ เป็นเวลา 10 นาที

2.4 วิธีการเก็บรักษาเชื้อและการเตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงเป็นกล้าเชื้อ

2.4.1 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อจุลินทรีย์มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) ตามข้อ 3.1 โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ บ่มที่ 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ แล้วนำมาเขี่ยลากเชื้อ (streak) ลงบนอาหารใหม่ (subculture) ทุกๆ 1 เดือน และยังมีอีกวิธีหนึ่งคือ การเติมพาราฟินเหลว (liquid parafin) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเททับบนผิวหน้าอาหารแข็งเอียงที่มีเชื้อเจริญอยู่ นำไปเก็บรักษาในตู้แช่แข็ง (deep freezer)อุณหภูมิ - 70°ซ เพื่อเป็น stock culture

2.4.2 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเป็นกล้าเชื้อ

นำเชื้อที่เก็บรักษาไว้มาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อใหม่ บ่มที่ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วถ่ายเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) กระจายเชื้อ (resuspend) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.35-0.40 ถ่ายสารผสมหัวเชื้อปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ตามข้อ 2.3.2

2.5 การศึกษาการเติบโตของ *Alcaligenes sp.* A-04

2.5.1 วิธีหาค่าความเข้มข้นของเซลล์ โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร วิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของเซลล์

นำน้ำหมักที่เก็บในแต่ละช่วงเวลามาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ค่า OD_{600} (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร) อยู่ในช่วง 0.1 ถึง 0.5 แล้วบันทึกค่าไว้ นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง และ OD_{600} (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยใช้สูตรดังนี้

น้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./มล.) = (1/ความชัน) x OD_{600} x ค่าการเจือจาง (dilution)

2.5.2 การคัดเลือกอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสม เพื่อให้ได้เชื้อที่มีปริมาณมาก

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 4.2 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร (2 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ที่เติมฟรักโตสเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง นำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเติบโต แล้วคัดเลือกอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมในการเตรียมกล้าเชื้อเพื่อให้ได้เชื้อปริมาณมาก

2.6 การศึกษาผลของกรดอะมิโนบางชนิดต่อการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes sp.*A-04

2.6.1 นำกล้าเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.5.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (2 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ถ่ายลงในอาหาร MSM ที่มีการเติมกรดอะมิโนเป็นซัพพลีเมนต์ดังนี้

ชนิดของกรดอะมิโน	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
L-glutamine	50
L-glutamic	50
L-aspartic	50
L-asparagine	50
L-proline	50

ชนิดของกรดอะมิโน	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
L-threonine	50
L-lysine	50
L-arginine	50
L-cystaine	50
L-methionine	50
L-isoleucine	50
L-leucine	50

เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง วิเคราะห์หาปริมาณPHB หาค่าPHB เป็นเปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง หาค่าชีวมวลส่วนที่เหลือ วิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ถูกใช้ไป คัดเลือกชนิดของกรดอะมิโนที่ให้ปริมาณPHB เป็นเปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูง และนำมาแปรผันหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อนำมาใช้เป็นซัพพลีเมนต์สำหรับขั้นตอนการผลิตPHB จาก *Alcaligenes sp.* A-04 ต่อไป

2.6.2 นำกล้าเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.5.2 ถ่ายลงในอาหาร MSM ที่มีการเติมกรดอะมิโนที่พบว่ามีผลกระตุ้นการสังเคราะห์ และสะสมPHB โดย *Alcaligenes sp.* A-04 เพื่อทำการแปรผันความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.6.1

ชนิดของกรดอะมิโน	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
L-methionine	25
L-methionine	50
L-methionine	75
L-methionine	100
L-isoleucine	25
L-isoleucine	50
L-isoleucine	75
L-isoleucine	100

ชนิดของกรดอะมิโน	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
L-leucine	50
L-leucine	100
L-leucine	125
L-leucine	150
L-arginine	25
L-arginine	50
L-arginine	75
L-arginine	100
L-arginine	125

โดยวิธีการเลี้ยงเชื้อ การเก็บตัวอย่าง และการวิเคราะห์ตัวอย่างทำเช่นเดียวกับที่บรรยายไว้ในข้อ 2.6.1

2.7. การศึกษาผลของกรดไขมันบางชนิดต่อการสังเคราะห์ PHB โดย *Alcaligenes sp.* A-04

นำกล้าเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.5.2 ถ่ายลงในอาหาร MSM ที่มีการเติมกรดไขมันเป็นซัพพลีเมนต์ดังนี้

ชนิดของกรดไขมัน	ความเข้มข้น
กรดโอเลอิก	1.0 มิลลิโมลาร์
กรดโอเลอิก	2.5 มิลลิโมลาร์
กรดโอเลอิก	5.0 มิลลิโมลาร์
กรดโอเลอิก	10.0 มิลลิโมลาร์
กรดโอเลอิก	15.0 มิลลิโมลาร์

โดยวิธีการเลี้ยงเชื้อ การเก็บตัวอย่าง และการวิเคราะห์ตัวอย่างทำเช่นเดียวกับที่บรรยายไว้ในข้อ 2.6.1 (โดยการทดลองที่ใช้กรดโอเลอิกเป็นซัพพลีเมนต์ จะเติม Brij 35 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นเซอร์แฟกแตนท์ (surfactant))

2.8. การศึกษาผลของกรดอินทรีย์ที่มีผลต่อการสังเคราะห์ PHB โดย *Alcaligenes sp.* A-04 นำกล้าเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.5.2 ถ่ายลงในอาหาร MSM ที่มีการเติมกรดอินทรีย์เป็นซัพพลีเมนต์ดังนี้

ชนิดของกรดอินทรีย์	ความเข้มข้น(กรัมต่อลิตร)
กรดกลูโคนิก	0.25
กรดกลูโคนิก	0.50
กรดกลูโคนิก	0.75
กรดกลูโคนิก	1.00
กรดมาโลนิก	0.25
กรดมาโลนิก	0.50
กรดมาโลนิก	0.75
กรดมาโลนิก	1.00
กรดโพรพิโอนิก	0.25
กรดโพรพิโอนิก	0.50
กรดโพรพิโอนิก	0.75
กรดโพรพิโอนิก	1.00
กรดบิวทีริก	0.25
กรดบิวทีริก	0.50
กรดบิวทีริก	0.75
กรดบิวทีริก	1.00

โดยวิธีการเลี้ยงเชื้อ การเก็บตัวอย่าง และการวิเคราะห์ตัวอย่างทำเช่นเดียวกับที่บรรยายไว้ในข้อ 2.6.1

2.9 วิธีหาปริมาณฟรักโตสในน้ำหมัก

ใช้วิธีของ Bernfeld (1955) โดยนำน้ำหมักที่ทำการปั่นแยกเซลล์ออกแล้วปริมาณ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylic acid: DNSA reagent) (ภาคผนวก ก) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มา

เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างฟรักโตสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำมาหาปริมาณฟรักโตสโดยใช้สูตรดังนี้

ปริมาณฟรักโตส (มก./มล.) = (1/ความชัน) x OD_{540} x ค่าการเจือจาง

2.10 วิธีหาปริมาณมวลเซลล์ที่ไม่รวมPHB (residual biomass)

หาได้จากการนำปริมาณPHB ลบออกจากน้ำหนักเซลล์แห้ง มีหน่วยเป็นกรัม/ลิตร

2.11 วิธีหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก

ใช้วิธีของ Kempers (1974) โดยนำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำน้ำหมักที่เจือจางแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมโปแตสเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 2 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย EDTA 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นเติมฟีนอลไนโตรพัสซายดีรีเอเจนท์ 2 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรท์รีเอเจนท์ 4 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดประจุ 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจน และค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร จากนั้นนำมาหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต โดยใช้สูตรดังนี้

ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต(มก./มล.) = OD_{636} x (1/ความชัน) (1/1000)
x (ค่าการเจือจาง/5)x (132/28)

2.12. วิธีการสกัดแยก PHB จากเซลล์

การสกัดแยก PHB (เป็นวิธีที่ปรับปรุงจากวิธีของ Brivonese และ Sutherland, 1989 โดยอรุณ ชาญชัยเชาวีวัฒน์, 2536) โดยนำน้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้วมีฝาเกลียวปิดขนาด 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนของเซลล์ไว้ แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ หรือคลอรอกซ์ (clorox) 1.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วยอะซิโตน 5 มิลลิลิตร แล้วปั่นล้างเอาอะซิโตนออก จากนั้นเอาส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วยเอทธานอลบริสุทธิ์ 99.80 เปอร์เซ็นต์ 5 มิลลิลิตร แล้วปั่นล้างด้วยอัตราเร็วและเวลาเท่าเดิมเอาเอทธานอลออก เก็บส่วนของตะกอนไว้ นำไปอบที่อุณหภูมิ 60°ซ เป็นเวลา 14 ชั่วโมง นำตะกอนที่ได้จากการอบนี้มาเติมคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 1 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นนำไปปั่นเก็บส่วนใสไว้ นำส่วนที่เป็นตะกอนไปสกัด PHB อีกครั้ง รวมส่วนใสที่กรองได้ด้วย

กระดาษกรองเบอร์ 1 ปรับปริมาตรของส่วนใสที่กรองได้เป็น 10 มิลลิลิตร PHB จะละลายอยู่ใน คลอโรฟอร์ม เก็บส่วนนี้นำไปวิเคราะห์ปริมาณ PHB ต่อไป

2.13 การวิเคราะห์ปริมาณ PHB ที่สกัดแยกได้

นำสารละลาย PHB ที่สกัดได้ในข้อ 2.12 มาเจือจางด้วยคลอโรฟอร์มในอัตราส่วนที่เหมาะสม แล้วแบ่งมา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง อบให้แห้งในตู้อบ 80 °ซ 30 นาที เพื่อให้ส่วนของคลอโรฟอร์มระเหยหมด นำส่วนของPHB ที่อยู่ในหลอดมาเติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น 3 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณPHB โดยเปรียบเทียบกับความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ PHB มาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข) ซึ่งคำนวณเป็นกรัมของPHB ได้โดยใช้สมการดังนี้

PHB (กรัม/น้ำหมัก 1 ลิตร) = OD_{235} x 1/ความชัน x 3 ---- .(1)

PHB เป็นไมโครกรัมในกรดซัลฟุริก 3 มล. หรือในคลอโรฟอร์มที่เจือจาง 0.1 มล.

= (1) x 1/0.1 x ค่าการเจือจาง x 10 ---- (2)

PHBเป็นไมโครกรัมในคลอโรฟอร์ม 10 มล.

= (2) x $1/10^6$ ----------(3)

PHBเป็นกรัมในคลอโรฟอร์ม 10 มล. หรือปริมาณ PHB จากน้ำหมัก 5 มล.

= (3) x 1/5 x 1,000 -------- (4)

ปริมาณ PHB คิดเป็น
กรัม/ลิตร (ของน้ำหมัก)

โดยที่ 1/ความชัน ได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ PHB มาตรฐาน และค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร

2.14 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน โดยใช้เครื่องวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน L-8500A (HITACHI , JAPAN)

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้วกรองผ่านกระดาษกรองมิลลิพอร์ ฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 40 ไมโครลิตรเข้าเครื่องวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน โดยมีภาวะ ดังนี้

Analysis column : 4.6 มิลลิเมตร ID x 60 มิลลิเมตร

resin : HITACHI ion exchange resin (2622 SC) ซึ่งบรรจุสำเร็จใน analysis column

Ammonia filter

column :4.6 มิลลิเมตร ID x 40 มิลลิเมตร

rasin : rasin สำหรับ Ammonia filter (2650L) ซึ่งบรรจุสำเร็จใน Ammonia filter column

detector : Photometer ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

อัตราการไหล : 0.01 มิลลิลิตร/นาที

ปริมาตรที่ฉีด : 40 ไมโครลิตร