บทที่ 3
วิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

เก็บตัวอย่างเศษของแข็งเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋องจากบริษัท ลำปางฟู้ดส์ จำกัด จังหวัดลำปาง ปลายเดือนสิงหาคม ปี พ.ศ.2550 และรำละเอียดจากโรงงานผลิตอาหารสุกร บริษัท แม่ทา พี.ดี. จำกัด จังหวัดลำพูน ในเดือนกันยายน ปี พ.ศ.2551 วัตถุดิบเศษของแข็งเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋อง มีน้ำเป็นองค์ประกอบร้อยละ 81.5 มีค่า a_w 0.98 จึงต้องนำวัตถุดิบมาผ่านขั้นตอนการอบแห้งและบดเพื่อสะดวกต่อการเก็บรักษา เนื่องจากยีสต์และราประเภท osmophile และ xerophile สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีค่า a_w มากกว่า 0.6 (Fellows, 1993) ภายหลังขั้นตอนการบดเศษของแข็งเหลือทิ้งมีค่าความชื้นฐานแห้งร้อยละ 7.4 และมีค่า a_w 0.37 ส่วนรำละเอียดมีค่าความชื้นฐานแห้งร้อยละ 11.6 และมีค่า a_w 0.61

3.2 เชื้อจุลินทรีย์

ศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลและเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสจากจุลินทรีย์ 15 สาย-พันธุ์ ได้แก่ *Candida utilis* จำนวน 6 สายพันธุ์ (TISTR 5001, 5032, 5043, 5046, 5198, และ 5352), *Saccharomyces cerevisiae* จำนวน 3 สายพันธุ์ (TISTR 5020, 5339, และ 5606), *Escherichia coli* จำนวน 2 สายพันธุ์ (TISTR 361 และ 1261), *Klebsiella* sp. จำนวน 1 สายพันธุ์ (TISTR 1383), *Zymomonas mobilis* จำนวน 3 สายพันธุ์ (TISTR 405, 548, และ 550) และศึกษากระบวนการผลิตฟอสเฟตไอออนจากจุลินทรีย์ 12 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus foetidus* จำนวน 1 สายพันธุ์ (TISTR 3461), *A. fumigatus* จำนวน 3 สายพันธุ์ (TISTR 3100, 3239, และ 3464), *A. niger* จำนวน 2 สาย-พันธุ์ (TISTR 3063 และ 3089), *Trichoderma reesei* จำนวน 2 สายพันธุ์ (TISTR 3080 และ 3081), *Bacillus circulans* จำนวน 1 สายพันธุ์ (TISTR 907), *B. pumilus* จำนวน 1 สายพันธุ์ (TISTR 061) *Lactobacillus fermentum* จำนวน 1 สายพันธุ์ (TISTR 055) และ *L. jensenii* จำนวน 1 สายพันธุ์ (TISTR 1342) รวมทั้งหมด 27 สายพันธุ์ จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) นำมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนและเก็บใน glycerol stock แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 สารเคมี

1. กรดไฟติก (Phytic acid sodium salt, $C_6H_{18}O_{24}P_6 \cdot xNa \cdot yH_2O$, Sigma, Switzerland)
2. ไอรอน (II) ซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต (Iron (II) sulfate heptahydrate, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, Quality Reagent Chemical, New Zealand)
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH, Labscan Asia, Bangkok, Thailand)
4. แอมโมเนียมโมลิปเดต (Ammonium molybdate, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, Ajax Finechem, NSW, Australia)
5. แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulphate hydrated, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Ajax Finechem, NSW, Australia)
6. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Di-potassium hydrogen phosphate, K_2HPO_4, Merck, Darmstadt, Germany)
7. น้ำตาลมอลโตส (Maltose monohydrate,$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$, Merck, Darmstadt, Germany)
8. น้ำตาลฟรุกโตส (*D* - Fructose, $C_6H_{12}O_6$, Asia Pacific Specialty Chemicals, NSW, Austraria)
9. น้ำตาลซูโครส (Sucrose, $C_{12}H_{22}O_{11}$, Ajax Finechem, NSW, Australia)
10. น้ำตาลกลูโคส (*D*-Glucose, $C_6H_{12}O_6$, Ajax Finechem, NSW, Australia)
11. กรดซิตริก (Citric acid, $HOC(COOH)(CH_2COOH)_2 \cdot H_2O$, Ajax Finechem, NSW, Australia)
12. กรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid, CCl_3COOH, VWR International, Poole, England)
13. กรดอะซิติก (Acetic acid, CH_3COOH, Labscan Asia, Bangkok, Thailand)
14. กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid, H_2SO_4, Labscan Asia, Bangkok, Thailand)
15. อะซิโตน (Acetone, CH_3COCH_3, Labscan Asia, Bangkok, Thailand)
16. เอทานอล (Ethanol, C_2H_5OH, Merck, Darmstadt, Germany)
17. เบนซาลดีไฮด์ (Benzaldehyde, C_7H_6O, Poch SA, Sowinskiego, Poland)
18. อะเซตาลดีไฮด์ (Acetaldehyde, C_2H_4O, Riedel-de Haen, Germany)
19. สีย้อมคูมาซีบริลเลี่ยนบลู (Coomassie Blue G – 250, Bio-Rad, Califonia, USA)
20. เอนไซม์อัลฟ่าอะไมเลส (α - amylase, Sigma, Steinheim, Germany)
21. เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase, Fluka, Steinheim, Germany)
22. เอนไซม์อะไมเลสเกรดการค้า (Union Science, Chiang Mai, Thailand)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

23. เอนไซม์ผสมกลูคาเนส เพนโทซาเนสและเฮมิเซลลูเลส (Ronozyme®VP (CT), Novozymes, Bagsvaerd, Denmark)
24. อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปเอ็มอาร์เอส (MRS Broth, Labscan, Spain)
25. สารสกัดยีสต์ (Yeast Extract, Hardy Diagnostics, Santa maria, USA)
26. สารสกัดเนื้อวัว (Beef Extract, Hardy Diagnostics, Santa maria, Califonia, USA)
27. สารสกัดมอลท์ (Malt Extract, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)
28. เปปโตน (Meat Peptone, Hardy Diagnostics, Santa maria, Califonia, USA)
29. โบไวน์อัลบูมิน (Albumin bovine fraction V, VWR International, Pool, England)
30. อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile, Merck, Darmstadt, Germany)
31. สารละลาย pH มาตรฐานที่ระดับ pH 4.0, 7.0 และ 10.0 (Ajax, Seven Hills, Australia)
32. เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (ADH, Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
33. ไนโคตินาไมด์ อะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ (NADH disodium salt, Roche, Mannheim, Germany)
34. โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (Sodium hydrogen carbonate, $NaHCO_3$, Ajax, Wellington, New Zealand)
35. ไทอามีนไพโรฟอสเฟต (thiamine pyrophosphate, $C_{12}H_{19}ClN_4O_7P_2S$, Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
36. โซเดียมไพรูเวต (Sodium pyruvate, $C_3H_3NaO_3$, Fluka, St. Louis, USA)

3.4 อุปกรณ์

1. เครื่องวัด pH (Eutech Technology, Model No. CyberScan pH510, Nijkirk, Japan)
2. เครื่องวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (hand refractometer, ATAGO, Model No. N-1α , Tokyo, Japan)
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (double-beam spectrophotometer, PerkinElmer Instruments, Model No. Lambda 25 UV/VIS Spectrometer, Shelton, USA,)
4. เครื่องผสมแบบวอร์เท็ค (vortex mixer, LMS, Model No. VTX-3000L Tokyo, Japan)
5. เครื่องหมุนเหวี่ยงตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) (Nuve, Model No. NF200, Angara, Turkey)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. เครื่องหมุนเหวี่ยง Eppendorf (Eppendorf, Model No. Minispin 5452, Hamburg, Germany)
7. ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ Memert (Memert, Model No. 400, Oxford, United Kingdom)
8. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Ohaus, Model No. ARC120, New Jersey, USA)
9. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Ohaus, Model No. AR2140, New Jersey, USA)
10. ตู้เพาะเลี้ยงเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (JJ ScienceLab, Model No. i250, Bangkok, Thailand)
11. ถังฆ่าเชื้อแบบเคลื่อนย้ายได้ (portable pressure sterilizer) (All American, Model No. 1925X และ 1941X, Wisconsin, USA)
12. เครื่องวัดความชื้น (Kett Electric Laboratory, Model No. FD-620, Tokyo, Japan)
13. เครื่องวัดค่า water activity (a_w) (Novasina MS-1-Set-a_w, Switzerland)
14. เครื่อง HPLC (Agilent Tchnologies, Model No.1200, Santa Clara, California, USA)
    - 14.1 คอลัมน์ Aminex® HPX-87H Ion Exclusion ขนาดอนุภาค 9 ไมโครเมตร (BioRad, Hercules, California)
    - 14.2 คอลัมน์ Alltima™ C8 ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร (Alltech, Lexington, Kentucky)
    - 14.3 เครื่องวัดการหักเหแสง (Agilent Technologies, Model No. G1362A, Santa Clara, California, USA)
    - 14.4 ตู้อบคอลัมน์ (Agilent Technologies, Model No. G1316A, Santa Clara, California, USA)
    - 14.5 เครื่อง Diode Array Detector (DAD) (Agilent Technologies, Model No. G1315D, Santa Clara, California, USA)

3.5 วิธีการศึกษา

3.5.1 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อและการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ของแต่ละสายพันธุ์

3.5.1.1 อาหารเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ในระดับ 10 มิลลิลิตร

อาหารเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ (แสดงวิธีเตรียมในภาคผนวก ก) จำแนกได้ 4 ชนิด ดังตารางที่ 3.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

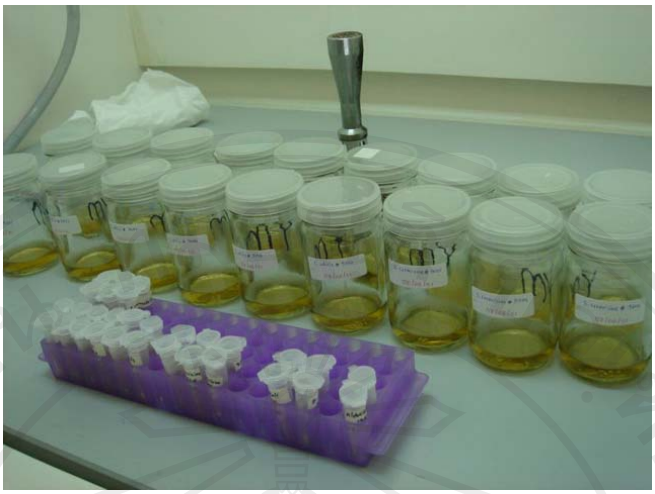
ตารางที่ 3.1 อาหารเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อจุลินทรีย์

อาหารเลี้ยงเชื้อ	สายพันธุ์	หมายเลข TISTR
Nutrient broth	*E. coli*	361, 1261
	Klebsiella sp.	1383
	B. circulans	907
	B. pumilus	061
Yeast medium	*C. utilis*	5001, 5032, 5043, 5046, 5198, 5352
	S. cerevisiae	5020, 5339, 5606
	A. foetidus	3461
	A. fumigatus	3100, 3239, 3464
	A. niger	3063, 3089
	T. reesei	3080, 3081
Zymomonas medium	*Z. mobilis*	405, 548, 550
MRS medium (Lactobacilli de Man, Rogosa, Sharpe medium)	*L. fermentum*	055
	L. jensenii	1342

3.5.1.2 การเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อจุลินทรีย์ในระดับ 10 มิลลิลิตร

ละลายหัวเชื้อจุลินทรีย์ (working culture stock) แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แต่ละสายพันธุ์ในหลอด eppendorf ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อจุลินทรีย์ (inoculum media) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 150 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ หรือ aseptic technique (ภาพที่ 3.1) ทำการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดผลิตเอทานอลและอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25.6 องศาเซลเซียส (นพพลและคณะ, 2551) และเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดผลิตฟอสเฟตไอออนเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิเดียวกัน (วรายุทธและนพพล, 2552) เพื่อนำไปใช้เป็นหัวเชื้อในการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มมวลเซลล์

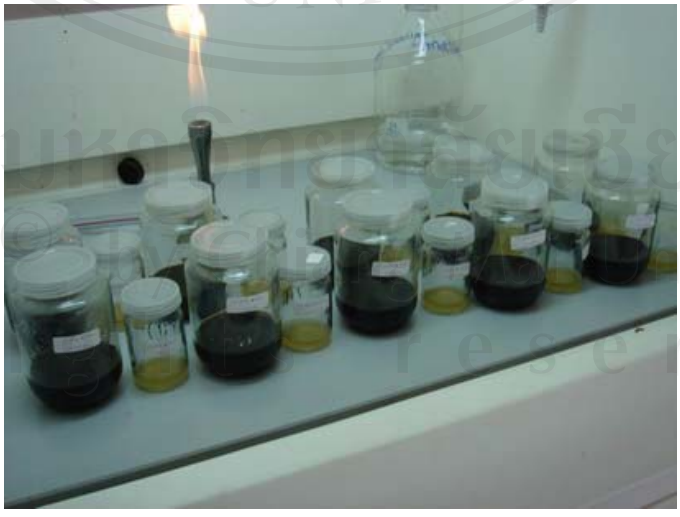
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3.1 การถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique)

3.5.1.3 การเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อจุลินทรีย์ในระดับ 100 มิลลิลิตร

เติมหัวเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในระดับ 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร ในขวดเพาะเลี้ยงเชื้อขนาด 550 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ภาพที่ 3.2) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อแล้วเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดผลิตเอทานอลและอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25.6 องศาเซลเซียส (นพพลและคณะ, 2551) และจุลินทรีย์ชนิดผลิตฟอสเฟตไอออนตามระยะเวลาที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ (ตารางที่ 3.2) ที่อุณหภูมิเดียวกัน



ภาพที่ 3.2 การเติมหัวเชื้อ 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.2 อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อและระยะเวลาเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดที่มีความสามารถผลิตฟอสเฟตไอออน

จุลินทรีย์	สายพันธุ์	อาหาร	ระยะเวลาเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อ (ชั่วโมง)	ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)
A. foetidus	3461	Yeast medium	18	72
A. fumigatus	3100	Yeast medium	18	48
A. fumigatus	3239	Yeast medium	18	72
A. fumigatus	3464	Yeast medium	18	48
A. niger	3063	Yeast medium	18	72
A. niger	3089	Yeast medium	18	168
T. reesei	3080	Yeast medium	18	24
T. reesei	3081	Yeast medium	18	48
B. circulans	907	Nutrient broth	18	120
B. pumilus	061	Nutrient broth	18	168
L. fermentum	055	MRS medium	18	72
L. jensenii	1342	MRS medium	18	72

ที่มา: วรายุทธ และนพพล (2552)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.2 การศึกษาหาปริมาตรกรดซัลฟิวริกที่เหมาะสมในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส

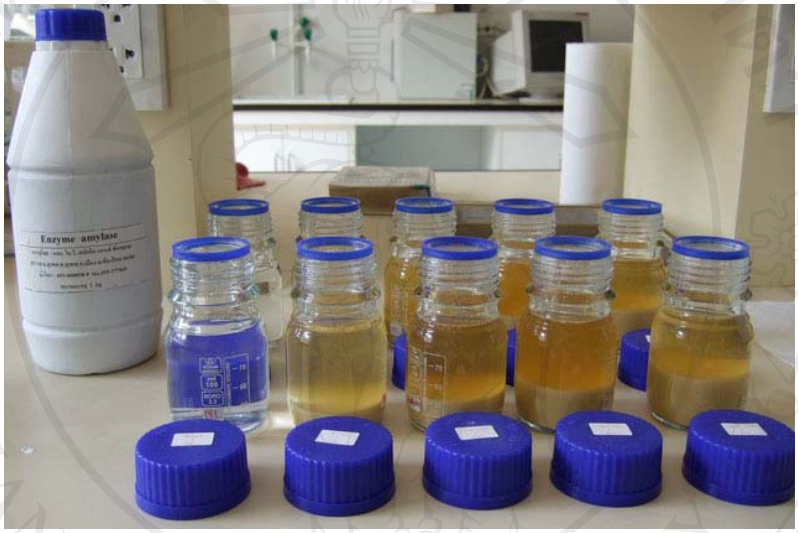
เตรียมสารผสมระหว่างแป้งข้าวโพด 10 กรัมและน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จำนวน 20 ขวด แช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ปรับให้ได้อุณหภูมิคงที่ 60 องศาเซลเซียส จึงทำการเติมเอนไซม์อะไมเลสเกรดการค้า ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อเริ่มการย่อย ตามด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร ในขวดทดลอง 10 ขวดแรก และเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นในช่วงปริมาตรเดียวกันในขวดทดลอง 10 ขวดที่เหลือ จากนั้นทำการย่อยต่อเป็นเวลา 10 นาที ก่อนเก็บตัวอย่างสารผสม 10 มิลลิลิตร จากแต่ละขวดมาหมุนเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 5,000 รอบต่อนาที (2,822xg) เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำส่วนของเหลวใสไปวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลที่ย่อยได้ ทำซ้ำการทดลองสองครั้ง ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Skoog *et al*. (1996) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95ทั้งนี้ระดับ pH ที่วัดได้หลังการเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร มีค่า 0.98 ± 0.03

3.5.3 การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่ได้หลังการย่อยเศษของแข็งเหลือทิ้งระหว่างเอนไซม์อะไมเลสเกรดบริสุทธิ์และเอนไซม์อะไมเลสเกรดการค้า

เตรียมสารผสมเศษของแข็งเหลือทิ้งในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีสัดส่วนของแข็งต่อน้ำกลั่นร้อยละ 0.0, 5.0, 7.5, 10.0 และ 12.5โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วทำการเติมเอนไซม์เกรดบริสุทธิ์และเกรดการค้า โดยจำแนกออกเป็น 2 กรณี ในกรณีแรกเติมเอนไซม์อัลฟ่า-อะไมเลส (α-amylase) เกรดบริสุทธิ์ ผสมให้เข้ากันดีแล้วทำการย่อยที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) 1 กรัม แล้วทำการย่อยต่อที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (วรายุทธและนพพล, 2551; สายศิริ, 2545) ส่วนตัวอย่างชุดที่สองใช้เอนไซม์อะไมเลสเกรดการค้าในการย่อยภายใต้สภาวะเดียวกัน (ภาพที่ 3.3) เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นตามปริมาตรที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.5.2 จากนั้นนำตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยง เพื่อเก็บของเหลวใสสำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลที่ย่อยได้ด้วยเครื่อง HPLC ทำการทดลองซ้ำสองครั้ง และใช้แป้งข้าวโพดเป็นตัวอย่างชุดควบคุม ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Skoog *et al*. (1996) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ก่อนทำการคัดเลือกชนิดเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการทดลองตอนต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(ก)



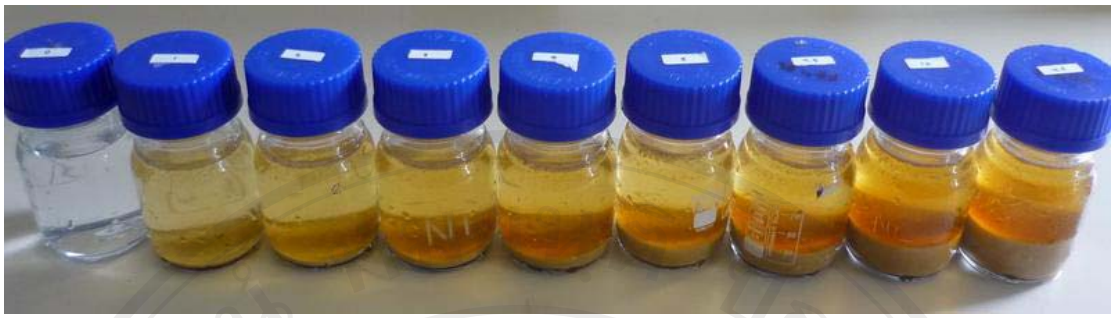
(ข)

ภาพที่ 3.3 เศษของแข็งเหลือทิ้งที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส (ก) เกรดบริสุทธิ์ (ข) เกรดการค้า

3.5.4 การศึกษาสัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋องต่อของเหลวที่เหมาะสม

3.5.4.1 หาสัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อน้ำกลั่นที่เหมาะสม สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดผลิตเอทานอลและอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอล จากการเตรียมเศษของแข็งเหลือทิ้งร้อยละ 0.0, 5.0, 7.5, 10.0 และ 12.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำการย่อยตัวอย่างด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.5.3 ปริมาณร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเติมเอนไซม์อะไมเลสอีกร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ทำการย่อยต่อที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ภาพที่ 3.4) หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตรจากข้อ 3.5.2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลตามวิธีในข้อ 3.5.9.1 ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Skoog *et al*. (1996) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3.4 เศษของแข็งเหลือทิ้งต่อน้ำกลั่นสัดส่วนต่างๆ ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส

3.5.4.2 หาสัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่ออะซิเตตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดผลิตฟอสเฟตไอออน จากการเตรียมตัวอย่างเศษของแข็งเหลือทิ้งร้อยละ 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 7.5, 10.0 และ 12.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำการย่อยตัวอย่างด้วยเอนไซม์ผสมกลูคาเนส เพนโทซาเนส และเฮมิเซลลูเลส ปริมาณร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที (รัฐศิรินทร์ และคณะ, 2545) ตามด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.5.3 ปริมาณร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเติมเอนไซม์อะไมเลสอีกร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ทำการย่อยต่อที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ภาพที่ 3.5) หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตรจากข้อ 3.5.2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลตามวิธีในข้อ 3.5.9.1 ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Skoog *et al*. (1996) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ภาพที่ 3.5 เศษของแข็งเหลือทิ้งต่ออะซิเตตบัฟเฟอร์สัดส่วนต่างๆ ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ผสมระหว่างผสมกลูคาเนส เพนโทซาเนส เฮมิเซลลูเลส และอะไมเลส

3.5.4.3 คำนวณคะแนนประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลจากข้อ 3.5.4.1 และ 3.5.4.2 เพื่อหาสัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อของเหลวที่เหมาะสม โดยคำนวณจากความเข้มข้นน้ำตาลที่ผลิตได้ต่อเศษของแข็งเหลือทิ้ง 100 กรัม ให้สัดส่วนเศษของแข็งต่อของเหลวที่ผลิตความเข้มข้นน้ำตาล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สูงสุดได้คะแนนเต็ม 100 ส่วนความเข้มข้นที่น้อยกว่านั้นให้คิดเป็นสัดส่วนคะแนนเทียบกับความเข้มข้นสูงสุด (ภาคผนวก ง)

3.5.5 การศึกษาระดับการผลิตเอทานอลและอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากทั้งหมด 15 สายพันธุ์

3.5.5.1 เตรียมแหล่งอาหารคาร์บอนสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 15 สายพันธุ์ ด้วยเศษของแข็งเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋อง ที่มีสัดส่วนระหว่างเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อน้ำกลั่นที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.5.4.1 และย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.5.3 ปริมาณร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเติมเอนไซม์อะไมเลสอีกร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ทำการย่อยต่อที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลตามวิธีในข้อ 3.5.9.1 แล้วปรับระดับน้ำตาลทั้งหมดให้มีความเข้มข้นมากกว่า 120 กรัมต่อลิตร ด้วยกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด 675.80 ± 3.17 กรัมต่อลิตร เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์มีแหล่งอาหารสำหรับเจริญเติบโตและผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลอย่างเพียงพอ

3.5.5.2 เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอล จำนวน 15 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 25.6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะตั้งนิ่ง

3.5.5.3 วางแผนการทดลองแบบ 1 x 15 factorial design in CRD ทำซ้ำการทดลองสองครั้ง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ในหัวข้อ 3.5.9.1 – 3.5.9.7 ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Skoog *et al*. (1996) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3.5.6 การศึกษาระดับการผลิตฟอสเฟตไอออนและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากทั้งหมด 12 สายพันธุ์

3.5.6.1 เตรียมแหล่งอาหารคาร์บอนสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยเศษของแข็งเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋องที่มีสัดส่วนระหว่างเศษของแข็งเหลือทิ้งต่ออะซิเตตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.4.2 และผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ผสมระหว่างกลูคาเนส เพนโทซาเนสและเฮมิเซลลูเลสที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ตามด้วยเอนไซม์อะไมเลสไมเลสชนิดที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.5.3 ปริมาณร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเติมเอนไซม์อะไมเลสอีกร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ทำการย่อยต่อที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.6.2 เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 12 สายพันธุ์ เพื่อผลิตฟอสเฟตไอออนที่อุณหภูมิ 25.6 องศาเซลเซียส ตามเวลาที่ระบุในตารางที่ 3.2

3.5.6.3 วางแผนการทดลองแบบ 1 x 12 factorial design in CRD ทำซ้ำการทดลองสองครั้ง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ในหัวข้อ 3.5.9.1 และ 3.5.9.3 – 3.5.9.8 ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Skoog *et al*. (1996) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

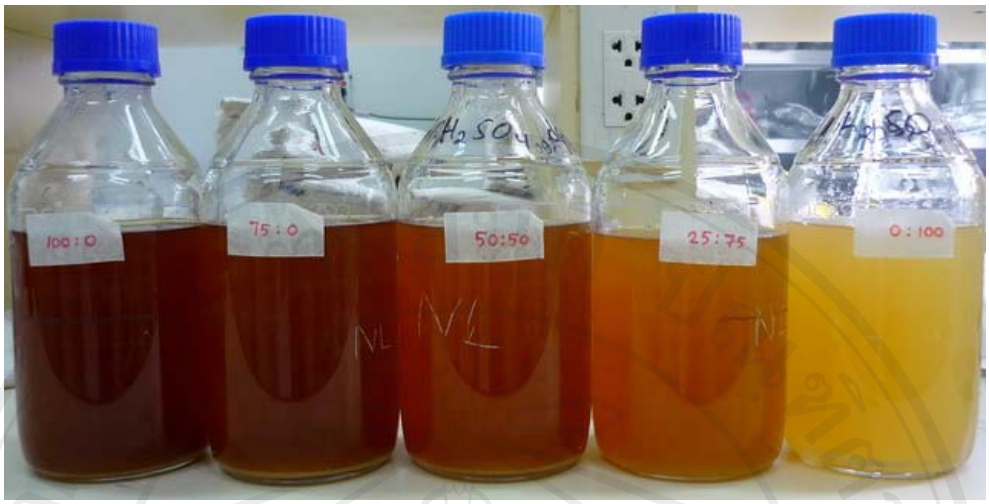
3.5.7 การศึกษาผลกระทบของสัดส่วนเศษของแข็งต่อรำข้าวต่างระดับต่อการผลิตเอทานอล อาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอล และฟอสเฟตไอออนของจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือก

3.5.7.1 เตรียมเศษของแข็งเหลือทิ้ง จากกระบวนการผลิตข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋องผสมรำข้าว 5 ระดับสัดส่วน (100:0, 25:75, 50:50, 75:25 และ 0:100) ดังภาพที่ 3.6 ที่มีสัดส่วนระหว่างเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อของเหลวที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.5.4 ทำการย่อยด้วยเอนไซม์ผสมระหว่างกลูคาเนส เพนโทซาเนส และเฮมิเซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 นาที ตามด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.5.3 ปริมาณร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเติมเอนไซม์อะไมเลสอีกร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ทำการย่อยต่อที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.5.7.2 เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกในหัวข้อ 3.5.5 จำนวน 4 สายพันธุ์ เพื่อผลิตเอทานอลและอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอล ดังการทดลองที่ 3.5.5.1 – 3.5.5.2 และเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกในหัวข้อ 3.5.6 จำนวน 4 สายพันธุ์ เพื่อผลิตฟอสเฟตไอออน ดังการทดลองที่ 3.5.6.1 – 3.5.6.2

3.5.7.3 วางแผนการทดลองแบบ 4 x 5 factorial design in CRD สำหรับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลและอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอล ทำซ้ำการทดลองสองครั้ง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ความเข้มข้นเอทานอลในหัวข้อ 3.5.9.1 และวิเคราะห์ความเข้มข้นอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลในหัวข้อ 3.5.9.2 และวางแผนการทดลองแบบ 4 x 5 factorial design in CRD สำหรับจุลินทรีย์ที่ผลิตฟอสเฟตไอออน ทำซ้ำการทดลองสองครั้ง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ความเข้มข้นฟอสเฟตไอออนในหัวข้อ 3.5.9.8 วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Skoog *et al*. (1996) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3.6 ตัวอย่างแหล่งอาหารคาร์บอนผสมรำข้าว 5 ระดับสัดส่วน (100:0, 25:75, 50:50, 75:25 และ 0:100)

3.5.8 การเก็บตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์

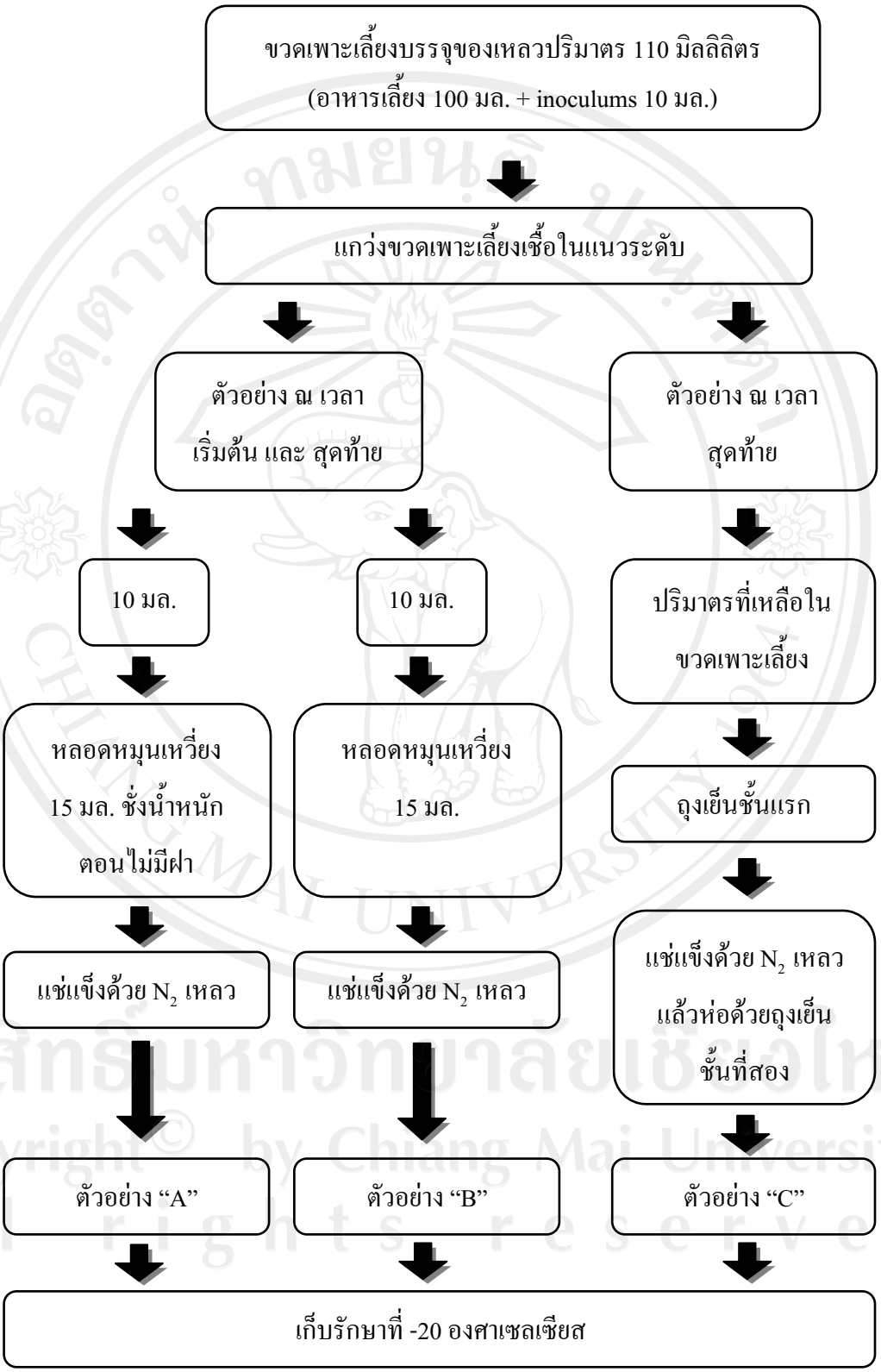
3.5.8.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสุดท้าย โดยแกว่งขวดเพาะเลี้ยงเชื้อในแนวระดับเพื่อให้ของเหลวและตะกอนเซลล์ผสมเข้ากันดี ก่อนใช้ปิเปตแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อดูดตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด โดยหลอดที่หนึ่งผ่านการชั่งน้ำหนักหลอดเปล่าขณะที่ไม่มีฝา เพื่อใช้ในการวัดระดับมวลชีวภาพแห้ง และหลอดที่สองสำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นของอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอล นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ ดังขั้นตอนการทดลองในภาพที่ 3.7

3.5.8.2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์

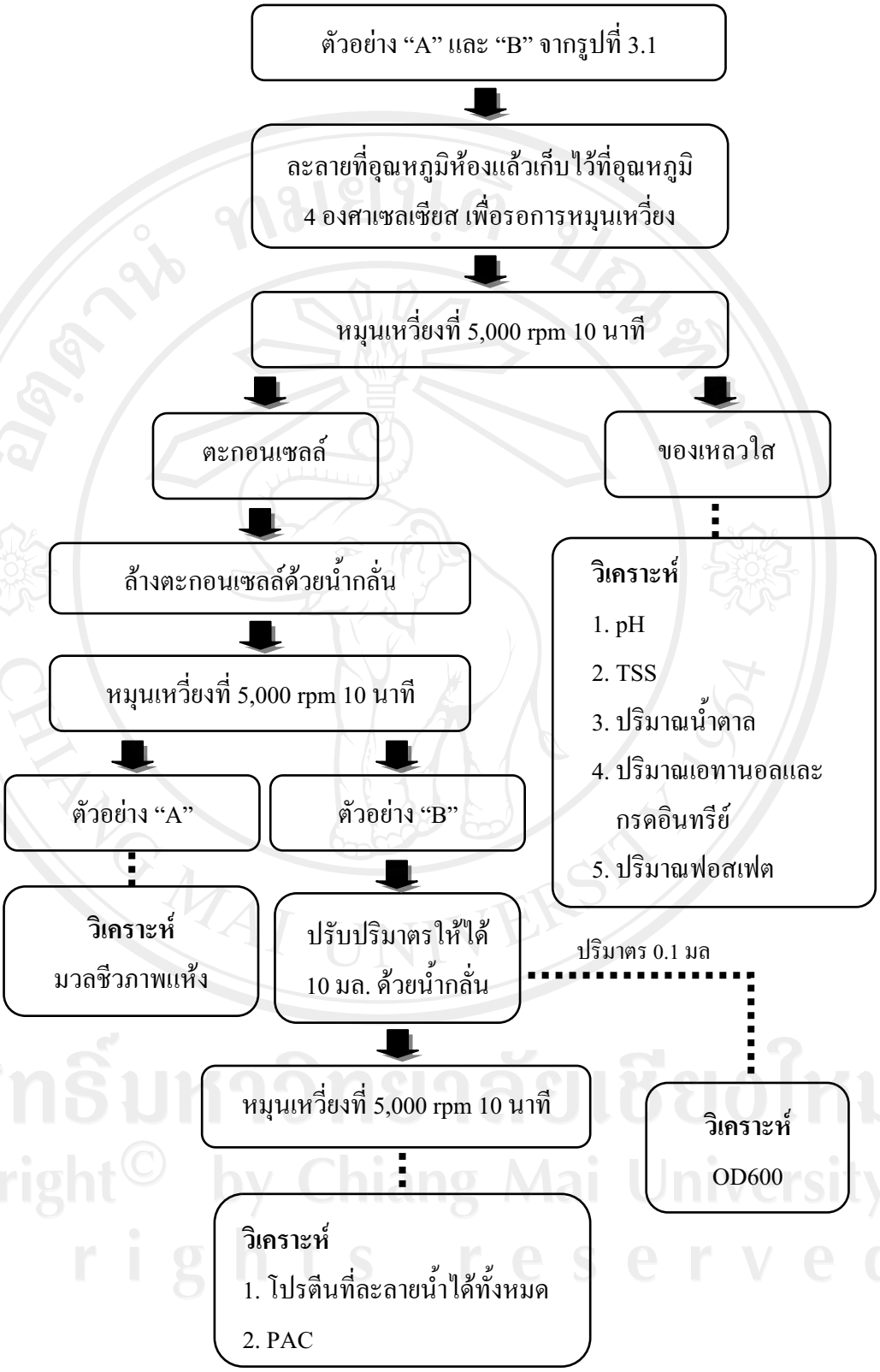
การเตรียมตัวอย่างทำได้โดยการนำหลอดหมุนเหวี่ยงบรรจุเชื้อจุลินทรีย์แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทั้งสองหลอดมาละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วหมุนเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง เป็นเวลา 10 นาที โดยหลอดหมุนเหวี่ยงหลอดแรกที่ชั่งน้ำหนักแล้วนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นมวลชีวภาพแห้ง ทั้งนี้มวลชีวภาพที่ได้ในหลอดที่สองจะนำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส และความเข้มข้นของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดในภายหลัง ส่วนของเหลวใสที่ได้จะนำไปวิเคราะห์ระดับ pH ความเข้มข้นของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด และความเข้มข้นเอทานอลด้วยเครื่อง HPLC แล้วจึงทำการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับสภาวะเริ่มต้นดังขั้นตอนการทดลองในภาพที่ 3.8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3.7 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างจากขวดเพาะเลี้ยงเชื้อ ณ เวลาเริ่มต้นและเวลาสุดท้าย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

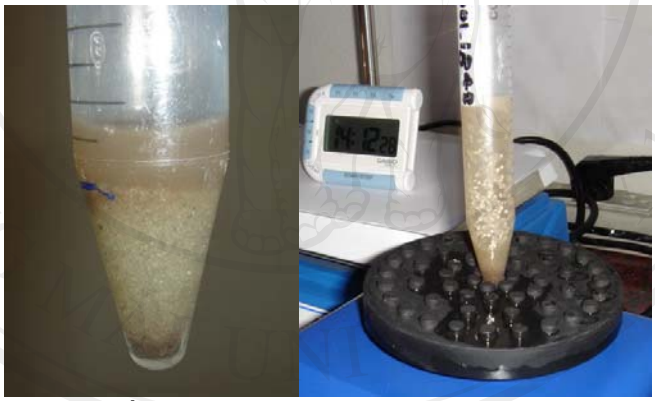


ภาพที่ 3.8 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.8.3 การทำให้ผนังเซลล์จุลินทรีย์เกิดรูรั่ว

นำตะกอนเซลล์สำหรับวัดความเข้มข้นอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอล และโปรตีนที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด จากการหมุนเหวี่ยงมาละลายในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมล่าร์ ที่ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.0 ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 4.5 โมล่าร์ เพื่อให้ได้ปริมาตรสารแขวนลอยเท่ากับ 1 มิลลิลิตร ด้วยเครื่อง vortex mixer ก่อนทำให้แข็งตัวอย่างรวดเร็วด้วยการแช่ลงในไนโตรเจนเหลว แล้วนำไปละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเปลี่ยนสถานะกลับเป็นของเหลวอีกครั้ง ทำซ้ำกระบวนการนี้ 3 รอบเพื่อทำให้ผนังเซลล์จุลินทรีย์มีความแข็งแกร่งน้อยลง จากนั้นทำการตวง glass bead ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงบรรจุสารแขวนลอยเซลล์ก่อนผสมให้เข้ากันดี จากนั้นนำหลอดหมุนเหวี่ยงไป vortex 1 นาที (ภาพที่ 3.9) แล้วแช่ในน้ำแข็งเกล็ด 1 นาที ทำซ้ำ 3 รอบ ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกเก็บส่วนของเหลวใสสำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลและโปรตีนที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 3.9 การทำให้ผนังเซลล์จุลินทรีย์เกิดรูรั่ว

3.5.9 การวิเคราะห์

3.5.9.1 ความเข้มข้นน้ำตาล และแอลกอฮอล์

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาล (กลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส) และเอทานอลด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Aminex® HPX-87H Ion Exclusion วัดค่าดัชนีหักเหแสง (refractive index) ด้วยเครื่องวัดการหักเหแสง ใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.005 โมล่าร์ ในน้ำกลั่น อัตราการไหล 0.75 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนตู้อบคอลัมน์ (column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส ใช้เวลาวิเคราะห์ตัวอย่าง (run time) 20 นาที และฉีดตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางในสัดส่วนที่เหมาะสมปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทั้งนี้สารมาตรฐานใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษาประกอบด้วยสารเคมีเกรดวิเคราะห์ที่ retention time (นาที) ดังนี้ น้ำตาลซูโครส (6.02 – 6.16) น้ำตาลกลูโคส (7.07 – 7.28) น้ำตาลฟรุกโตส (7.73 – 8.05) และเอทานอล (16.27 – 16.56)

3.5.9.2 ความเข้มข้นอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอล

การวิเคราะห์ความเข้มข้นอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลทำตามวิธีของ Rosche *et al*. (2001) โดยใช้สารตัวอย่างและสารละลายคาร์โบไลเกสบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข) อย่างละ 50 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา เติมกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 10 ไมโครลิตร กำจัดตะกอนที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง eppendorf ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที แยกส่วนของเหลวใสไปวิเคราะห์ความเข้มข้นอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลด้วยเครื่อง HPLC ใช้คอลัมน์ Alltima^{TM}C8 เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คืออะซิโตไนไตรล์ความเข้มข้นร้อยละ 32 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ผสมกับกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ในน้ำกลั่น อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตู้อบคอลัมน์ทำงานที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 283 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Diode Array Detector (DAD) ใช้เวลาวิเคราะห์ตัวอย่าง 20 นาที และฉีดตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางในสัดส่วนที่เหมาะสม ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ค่า retention time ของอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลอยู่ที่ 4.3 - 4.7 นาที

3.5.9.3 ความเข้มข้นมวลชีวภาพแห้งของเชื้อจุลินทรีย์

การวิเคราะห์ความเข้มข้นมวลชีวภาพแห้งตามวิธีของ Leksawasdi (2004) เริ่มจากการเทตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงไม่มีฝาที่ทราบน้ำหนัก ขนาด 15 มิลลิลิตร ทำการหมุนเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงตั้งโต๊ะเป็นเวลา 10 นาที เก็บของเหลวใสที่แยกได้ไปวิเคราะห์ แล้วนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปล้างด้วยน้ำกลั่น โดยการเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร จากนั้น vortex จนตะกอนเซลล์ที่ก้นหลอดกลายเป็นสารแขวนลอยในน้ำกลั่น ก่อนหมุนเหวี่ยงในสภาวะเดียวกันอีกครั้ง นำหลอดหมุนเหวี่ยงพร้อมตะกอนเซลล์ไปทำแห้งในตู้อบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำสองซ้ำ คำนวณความเข้มข้นของมวลชีวภาพแห้งในหน่วยกรัมต่อลิตร จากผลต่างมวลและปริมาตรตัวอย่างเริ่มต้น

3.5.9.4 ระดับความเป็นกรด - ด่าง (pH level)

การวิเคราะห์ระดับ pH ของสารละลายหรือบัฟเฟอร์ ด้วยเครื่องวัด pH ที่ผ่านการสอบเทียบด้วยสารละลายมาตรฐานที่ระดับ pH เท่ากับ 4.0, 7.0 และ 10.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.9.5 ความเข้มข้นของของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid, TSS)

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดด้วยเครื่องวัดค่าดัชนีหักเหแสง

3.5.9.6 ความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด

การวิเคราะห์ความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด ปรับปรุงจากวิธีการของ Bradford (1976) โดยใช้สีย้อมคูมาซีบริลเลี่ยนบลูเจือจางในอัตราส่วนหนึ่งต่อสี่เพื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส กับสารละลายโปรตีนมาตรฐานโบไวน์อัลบูมินหรือตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์โปรตีน ทั้งนี้ใช้สารละลายคูมาซีบริลเลี่ยนบลู ที่เจือจางแล้ว 1,250 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับตัวอย่าง 25 ไมโครลิตร ใน cuvette ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลังปฏิกิริยาดำเนินได้ 5 นาที ก่อนนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 ไมโครเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง แล้วคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างโดยเทียบกับเส้นโค้งมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0.17 - 1.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.5.9.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD600)

ผสมตัวอย่างที่ต้องการวัดค่า OD600 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่นปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร ใน cuvette ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิดแผ่นพาราฟิล์ม (parafilm) และผสมให้เข้ากันดี แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.5.9.8 ค่าความเข้มข้นฟอสเฟต

การวิเคราะห์ความเข้มข้นฟอสเฟตตามวิธีของ Cooper and Helen (1983) เริ่มจากนำสารละลายไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น หรือ ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลาย developing reagent (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง แล้วคำนวณความเข้มข้นของฟอสเฟตในตัวอย่างโดยเทียบกับเส้นโค้งมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0.0 – 1.0 มิลลิโมลต่อลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved