บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 ครุภัณฑ์

ตารางที่ 2-1 **ครุภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง**

ชนิดเครื่องมือ	แบบ – รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มมานซ์ลิควิด โครมาโตกราฟ	Shimadzu high performance liquid chromatograph model 4100	Shimadzu, Japan
เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ	Chromopack-Packard gas chromatograph	Chromopack-Packard, U.S.A.
เครื่องฟอร์เรียร์ทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์	Fourier-transform infrared spectrometer FT-IR 1760x	Perkin Elmer, U.S.A.
เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์	Shimadzu UV-visible uv-1201	Shimadzu, Japan
เครื่องปั่นเหวี่ยง	Immufuge II	Baxter, U.S.A.
	Hitashi refrigerated centrifuge himac CF7D2	Hitashi , Japan
เครื่องชั่งสาร	Mettler Toledo model PB153	Mettler Toledo , Switzerland
ตู้ควบคุมอุณหภูมิ	Stuart scientific total visibility incubator SI 60 D	Stuart scientific, U.K.
	Shel Lab incubator model TC1265	Sheldon manufacturic Inc. ,U.S.A.
เครื่องเขย่าฟลาสต์	Orbital shaker so 3	Stuart scientific, U.K.

ตารางที่ 2-1 (ต่อ) **ครุภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง**

ชนิดเครื่องมือ	แบบ – รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
อ่างควบคุมอุณหภูมิ	Shel Lab model 1265	Sheldon manufacturic Inc. ,U.S.A.
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	Orion pH meter model 420A	Orion research Inc., U.S.A.
เครื่องเขย่า	Vortex-Ginie model k-550-GE No. 16441	Scientific industries Inc., U.S.A.
เครื่องนึ่งฆ่าจุลินทรีย์	TOMY high-pressure steam sterilizer ES-315	TOMY, Japan
ตู้แช่แข็ง	Sunyo freezer	Sunyo Co. , Thailand
ตู้อบ	Memmert universal oven model UM600	Memmert GmbH Co. , Germany
กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์	Olympus model BX50	Olympus optical Co. , Japan

2.2 วัสดุและเคมีภัณฑ์

2.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

Pseudomonas oleovorans ATCC 29347 (TISTR 1097) เป็นสายพันธุ์ที่สั่งซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR สั่งซื้อมาจาก American type culture collection ประเทศสหรัฐอเมริกา) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ค้นพบและรายงานครั้งแรกโดย Schwartz, R.D. (1973) แล้วยืนยันการสร้าง PHA โดย Lageveen และคณะ (1988)

2.2.2 เคมีภัณฑ์

ตารางที่ 2-2 **เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง**

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
ดี- กลูโคส โมโนไฮเดรต (D (+) Glucose monohydrate)	Merck Ltd., Germany
โซเดียมออกตาโนเอต(Sodium octanoate 98%)	Aldrich Chemical Co., U.S.A.
นาย บลู เอ (Nile blue A)	Sigma Chemical Co., U.S.A.
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$)	J.T. Baker Inc., U.S.A.
โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	Merck Ltd., Germany
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	J.T. Baker Inc., U.S.A.
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)	Merck Ltd., Germany
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	Merck Ltd., Germany
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl.4H_2O$)	J.T. Baker Inc., U.S.A.
โคบอลต์ซัลเฟต ($CoSO_4.7H_2O$)	Fluka chemica , Switzerland
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)	J.T. Baker Inc., U.S.A.
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	J.T. Baker Inc., U.S.A.
คอปเปอร์คลอไรด์ ($CuCl_2.2H_2O$)	Fluka chemica , Switzerland
ทริส (Tris(hydroxymethyl)aminomethane)	Merck Ltd., Germany
คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$)	Merck Ltd., Germany
กรดซัลฟุริค (H_2SO_4)	Merck Ltd., Germany
เมทานอล (CH_3OH)	Merck Ltd., Germany

สารเคมีอื่นๆ ที่ใช้นอกจากที่กล่าวนี้ สั่งซื้อมาจากบริษัท Sigma Chemical Co., ประเทศสหรัฐอเมริกา, บริษัท Merck Ltd., ประเทศเยอรมนี, บริษัท J.T. Baker Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา และบริษัท Fluka chemica ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ เป็นต้น

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

2.3.1 อาหารสูตรอุดม nutrient broth ของ BBL, Becton Dickinson and Co. ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ประกอบด้วย

Pancreatic digest of gelatin	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม

2.3.2 อาหารสูตรเกลือแร่ E ของ Lageveen (Lageveen และคณะ, 1988; Brandl และคณะ, 1988) ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

(1). สารละลายเกลือแร่ (MT stock solution) 1 มิลลิลิตร

โดยสารละลายเกลือแร่ 1 ลิตร ประกอบด้วย

-เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	2.78	กรัม
-แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl.4H_2O$)	1.98	กรัม
-โคบอลต์ซัลเฟต ($CoSO_4.7H_2O$)	2.81	กรัม
-แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)	1.67	กรัม
-คอปเปอร์คลอไรด์ ($CuCl_2.2H_2O$)	0.17	กรัม
-ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.29	กรัม

(2). สารเคมีสำหรับทำสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ประกอบด้วย

-ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$)	1.1	กรัม
-ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	5.8	กรัม
-โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	3.7	กรัม

(3). สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ 10 มิลลิลิตร

(4). แหล่งคาร์บอน

โดย

- ในอาหารสูตรเกลือแร่ E ที่มีกลูโคส

แหล่งคาร์บอนที่ใช้คือ กลูโคส 10 กรัม/ลิตร

-ในอาหารสูตรเกลือแร่ E ที่มีออกตาโนเอต

แหล่งคาร์บอนที่ใช้คือ โซเดียมออกตาโนเอต(โดยใส่ให้มีความเข้มข้นในอาหารเลี้ยงเชื้อรวมเป็น) 10 มิลลิโมลาร์

-ในอาหารสูตรเกลือแร่ E ที่มีกลูโคสร่วมกับออกตาโนเอต

แหล่งคาร์บอนที่ใช้คือ กลูโคส 10 กรัม/ลิตร

โซเดียมออกตาโนเอต 10 มิลลิโมลาร์

ปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

ในการเตรียมอาหารสูตรเกลือแร่ จะต้องแยกนึ่งด้วยไอน้ำ(autoclave)องค์ประกอบทั้ง 4 ส่วนออกจากกัน

2.4 การเตรียมสารละลาย

2.4.1 สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส – กรดไฮโดรคลอริค 1.0 โมลาร์

ละลายทริส (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) 12.11 กรัม ในกรดไฮโดรคลอริค 1 โมลาร์ ปรับพีเอช เป็น 7.6 ด้วยกรดไฮโดรคลอริค 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

2.5 วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์

แบ่งเป็น 2 แบบ คือ

2.5.1 การเก็บระยะสั้น เก็บบนอาหาร nutrient agar ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วิธีนี้เก็บจุลินทรีย์ได้นานประมาณ 1 เดือน

2.5.2 การเก็บระยะยาว

ก. เก็บในกลีเซอรอล

ผสมเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวกับกลีเซอรอลที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ความเข้มข้นเป็น 50 เปอร์เซนต์กลีเซอรอลในขวดจุกเกลียวเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส วิธีนี้สามารถเก็บจุลินทรีย์ได้นานประมาณ 1 ปี

ข. เก็บโดยวิธี Lyophilization

นำเซลล์ที่เจริญบนอาหารวุ้นมาผสมกับ skim milk 10 เปอร์เซนต์ แล้วจึงนำไปเข้าเครื่อง ทำให้เซลล์แข็งตัวในสภาพสุญญากาศ น้ำในเซลล์จะระเหิดออกมา จุลินทรีย์จะอยู่ในสภาพแห้งและแข็ง สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้นานเป็น 10 ปี

2.6 วิธีการเลี้ยงเชื้อและวัดการเจริญของจุลินทรีย์

2.6.1 **การเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง** เขี่ยเชื้อจากหัวเชื้อตั้งต้น (stock culture) ด้วยลูปเขี่ยเชื้อแล้วลากบนอาหารในจานเพาะเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.6.2 **การเตรียมเชื้อตั้งต้น** (starter inoculum) ใช้ลูปเขี่ยเชื้อบริเวณขอบโคโลนีเดี่ยวๆ เลือกประมาณ 5 โคโลนี จากจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร nutrient agar ใส่ในอาหารสูตรอุดมชนิดเหลว nutrient broth 50 มิลลิลิตร เขย่าในเครื่องเขย่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วของการเขย่า 200 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปถ่ายลงในอาหารเหลว nutrient broth เดิม 200 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มิลลิลิตรโดยใช้เชื้อตั้งต้น 10 เปอร์เซนต์ ติดตามการเจริญโดยวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

2.6.3 **การเพาะเลี้ยงเชื้อ** ถ่ายเชื้อตั้งต้นที่เจริญอยู่ในระยะกึ่งกลางของการเจริญแบบทวีคูณ 10 เปอร์เซนต์ ลงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่มีแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด ใส่อาหาร 200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ติดตามการเจริญโดยวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยเก็บเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามเวลาที่ต้องการวัดด้วยเครื่องวัดความเข้มแสง

2.7 การย้อมดูลักษณะรูปร่างเซลล์

2.7.1 การย้อมดูลักษณะรูปร่างเซลล์ด้วยสีแกรม (Gram strain) ทำดังนี้

(1). กระจายเชื้อบนแผ่นสไลด์ ทำให้แห้งในอากาศ ผ่านเปลวไฟ

(2). ย้อมสีกรัมคริสตัลไวโอเลต 1 นาที

(3). ล้างด้วยน้ำ

(4). ย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน 1 นาที

(5).ล้างน้ำ

(6).ล้างสีออกโดยใช้ 95% เอทธานอล ซับให้แห้ง

(7). ย้อมสีซาฟรานินโอ 20-30 วินาที

(8). ล้างด้วยน้ำ ซับให้แห้ง

(9). ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวน้ำมัน

2.7.2 การย้อม PHA ในเซลล์ด้วยสีนายบลู เอ (PHA strain) (ตามวิธีของ Ostle และ Holt,1982)

(1). เตรียมสี 1% นายบลู เอ ประกอบด้วย

ผงนายบลู เอ	1	กรัม
น้ำกลั่น เติมให้ครบ	100	มิลลิลิตร

(2). ทำโดยนำน้ำหมักมาสเมียร์ลงบนแผ่นสไลด์ fixed ติดด้วยความร้อน นำแผ่นสไลด์ไปแช่ในสี 1% นายบลู เอ ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วยสารละลายกรดอะซิติก 8 % แล้วล้างน้ำตามอีกครั้ง ทิ้งให้แห้ง

(3). นำแผ่นสไลด์ที่ได้มาหยดน้ำกลั่น ปิดทับด้วย cover slip ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์กำลังขยาย 1000 เท่า เม็ดPHAจะเรืองแสงสีส้มเป็นจุดอยู่ภายในเซลล์

2.8 วิธีการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ PHA และ EPS

ทำตามลำดับดังนี้

2.8.1 **ปั่นแยก** ทำโดยนำน้ำหมักมาปั่นแยกเอาเซลล์ออก ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น ปั่นล้างเซลล์ต่อ ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ทริส - กรดไฮโดรคลอริค 1.0 โมลาร์ ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงสภาวะเช่นเดิม

2.8.2 **Lyophilization**โดยนำเซลล์ที่ปั่นล้างแล้วมาถ่ายใส่หลอดฝาเกลียวขนาด 16x125 เซนติเมตร นำมาเข้าเครื่องระเหิดแห้งภายใต้สูญญากาศ

2.8.3 **เก็บเซลล์แห้ง** ในหลอดฝาเกลียวขนาด 16x125 เซนติเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ PHA และ EPS ต่อไป

2.9 วิธีการสกัดแยกPHAจาก *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 และการทำให้บริสุทธิ์ (ปรับปรุงจากวิธีของ Timm และ Steinbuchel ,1990)

นำเซลล์ที่ชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งแล้วมาถ่ายใส่หลอดฝาเกลียวขนาด16x125เซนติเมตร จากนั้นทำการสกัดแยก PHA โดยใส่คลอโรฟอร์ม 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์ออกด้วยกระดาษกรอง แล้วนำไประเหยแห้งให้เหลือปริมาตรเพียง 1 ใน 4 ของปริมาตรเดิม นำไปตกตะกอนด้วยเมทานอล (ใช้ปริมาตรเป็น 10 เท่าของสารละลายในคลอโรฟอร์ม) นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสจนแห้งสนิท นำไปละลายด้วยคลอโรฟอร์มซ้ำอีกครั้ง แล้วทำตามขั้นตอนเดิมอีกครั้ง ชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้

2.10 วิธีการวิเคราะห์สัดส่วนพอลิเมอร์ (polymer content)ของ PHA (ตามวิธีของ Brandl และคณะ,1988)

2.10.1 ทำโดยนำเซลล์แห้ง จากข้อ 2..3 มาประมาณ 4 มิลลิกรัม ถ่ายใส่หลอดฝาเกลียวขนาด 16x125 เซนติเมตร จากนั้นใส่คลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร เมทานอล 0.85 มิลลิลิตร และกรดซัลฟุริค 0.15 มิลลิลิตร นำไปใส่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 140 นาที จากนั้นนำมาทิ้งให้เย็นแล้วใส่น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงเครื่องเขย่า นาน 1 นาที ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จะเกิดการแยกชั้นขึ้น ใช้ไปเปตดูดชั้นสารอินทรีย์ คือชั้นล่างออกมาเก็บในหลอดพลาสติกขนาดเล็ก (screw-cap vial) เก็บที่ตู้แช่แข็ง -40 องศาเซลเซียสจนกว่าจะวิเคราะห์

2.10.2 วิเคราะห์สัดส่วนพอลิเมอร์ ของ PHA ด้วยเครื่อง GC

<u>สภาวะที่ใช้</u>

ตารางที่ 2-3 สภาวะที่ใช้สำหรับวิเคราะห์สัดส่วนพอลิเมอร์ของ PHA ด้วยเครื่องGC

คอลัมน์ (Column)	Capillary (model 438A)
เครื่องตรวจวัด (detector)	Frame ionization detector
อุณหภูมิ injector ที่ใช้	200 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของคอลัมน์ที่ใช้	120 องศาเซลเซียส
Split	50:1
ปริมาตรที่ฉีด (injection volumn)	20 ไมโครลิตร

<u>สารมาตรฐานที่ใช้</u>

กรดอัลคาโนอิคเมทธิลเอสเทอร์ มีค่าเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time)

ตารางที่ 2-4 Retention time ของกรดอัลคาโนอิคเมทธิลเอสเทอร์แต่ละชนิด

กรดอัลคาโนอิคเมทธิลเอสเทอร์ที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอม (อะตอม)	Retention time
6	5.34
8	7.34
10	8.40
12	13.50

2.11 วิธีการวิเคราะห์ EPS จากน้ำหมัก (ตามวิธีของ Dubois,1956)

2.11.1 ทำโดยนำน้ำหมักจากข้อ 2.8.1 มา 2 มิลลิลิตร ถ่ายใส่หลอดฝาเกลียวขนาด 16x125 เซนติเมตร ใส่สารละลาย 80% ฟีนอล 1 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากัน จากนั้นใส่กรดซัลฟุริคเข้มข้น 5 มิลลิลิตร อย่างรวดเร็วแล้วผสมให้เข้ากัน โดยเขย่าอย่างแรงเครื่องเขย่า นาน 1 นาที นำไปใส่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาทิ้งให้เย็น จะเกิดสารประกอบสีเหลืองส้มขึ้น มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 490 นาโนเมตร สำหรับเฮกโซส

2.11.2 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดความเข้มแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยใช้ reagent blank

2.11.3 ทำกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆกันประมาณ 6 ค่า มาทำตามข้อ 2.11.1 เพื่อเทียบหาความเข้มข้นของ EPS ในน้ำหมัก

2.12 วิธีการสกัดแยก EPS จาก *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 และการทำให้บริสุทธิ์ (ดัดแปลงจากวิธีของ Brown และคณะ ,1969)

2.12.1 ทำโดยนำน้ำหมักจากข้อ 2.8.1 มา 2 มิลลิลิตร มากรองด้วยกระดาษกรอง pore size 0.45 ไมโครเมตร

2.12.2 ทำการตกตะกอนเมือกที่มี EPS โดยค่อยๆหยดน้ำหมักที่กรองแล้วลงในเอธานอลบริสุทธิ์ที่เย็นจัด ปริมาตร 6 มิลลิลิตร (ใช้สัดส่วน น้ำหมัก : เอทธานอล เท่ากับ 1 : 3) ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำซ้ำอีกครั้ง

2.12.3 ปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที

2.12.4 นำตะกอน EPS ที่ได้ไปอบแห้ง

2.12.5 นำตะกอน EPS แห้ง มาบ่ม(hydrolyzed) ด้วยกรดไฮโดรคลอริค ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ต้ม เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเจือจางความเป็นกรดด้วยน้ำ 4 มิลลิลิตร

2.12.6 ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบโดยเครื่อง HPLC

<u>สภาวะที่ใช้</u>

ตารางที่ 2-5 **สภาวะที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบโดยเครื่อง** HPLC

ชนิดของคอลัมน์	Aminex BioRad Carbohydrate Column HPX-87C
ขนาดคอลัมน์	ขนาด 300x7.8 มิลลิเมตร
ตัวนำพา .	น้ำกลั่น
อัตราการไหล	0.6 มิลลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด	refractive index
อุณหภูมิที่ใช้	25 องศาเซลเซียส
ปริมาตรที่ฉีด	20 ไมโครลิตร

<u>สารมาตรฐานที่ใช้</u>

มี retention time ของน้ำตาลต่างๆ ดังนี้

ตารางที่ 2-6 Retention time ของน้ำตาลแต่ละชนิด

น้ำตาล	Retention time
กลูโคส	4.96
มอลโตส	4.34
แมนโนส	6.06

2.13 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในน้ำหมัก

ไปเปตน้ำหมักจากข้อ 2.8.1 มา 20 ไมโครลิตร เติมสารละลาย O-Toluidine ลงไป 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาทีพอดี ทำให้เย็น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 630 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

2.14 วิธีการวิเคราะห์สารชีวภาพประเภทกรดอินทรีย์จากน้ำหมัก

2.14.1 ทำโดยนำน้ำหมักจากข้อ 2.8.1 มาประมาณ 2 มิลลิลิตร ถ่ายใส่หลอดฝาเกลียวขนาด 16x125 เซนติเมตร มากรองด้วยกระดาษกรอง pore size 0.45 ไมโครเมตร

2.14.2 นำไปวิเคราะห์สารชีวภาพประเภทกรดอินทรีย์จากน้ำหมักโดยเครื่อง HPLC

<u>สภาวะที่ใช้</u>

ตารางที่ 2-7 **สภาวะที่ใช้วิเคราะห์สารชีวภาพประเภทกรดอินทรีย์จากน้ำหมักโดยเครื่อง HPLC**

ชนิดคอลัมน์	Aminex BioRad Organic acids Column HPX-87H
ขนาดคอลัมน์	ขนาด 300x7.8 มิลลิเมตร
ตัวนำพา	กรดซัลฟุริค 10 มิลลินอร์มอล
อัตราการไหล	0.8 มิลลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด	UV 210 นาโนเมตร
อุณหภูมิที่ใช้	25 องศาเซลเซียส
ปริมาตรที่ฉีด	100 ไมโครลิตร

<u>สารมาตรฐานที่ใช้</u>

กรดอินทรีย์ผสม (BioRad mixed organic acid) มี retention time ของกรดอินทรีย์ต่างๆดังนี้

ตารางที่ 2-8 Retention time **ของกรดอินทรีย์แต่ละชนิด**

กรดอินทรีย์	Retention time	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)
กรดออกซาลิก (oxalic acid)	4.87	0.8
กรดซิตริก (citric acid)	5.93	4.0
กรดมาลิก (malic acid)	7.12	8.0
กรดซัคซินิก (succinic acid)	9.00	20.0
กรดฟอร์มิก (formic acid)	10.38	20.0
กรดอะซิติก (acetic acid)	11.35	40.0

2.15 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของสารชีวภาพที่สกัดได้ (product characterization)

นำ PHA ที่สกัดได้จากข้อ 2.9 และ EPS slime จากข้อ 2.12.4 มาประมาณ 0.5 กรัม มาวิเคราะห์พิสูจน์คุณสมบัติทางเคมีด้วยเครื่องฟอร์เรียร์ทรานฟอร์ม อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (FT-IR) ในช่วงความถี่ 400 – 4000 เซนติเมตร$^{-1}$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย