บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์การทดลอง

กล้องจุลทรรศน์ (Microscopy) รุ่น Alphaphot-2 YS2 ของบริษัท Nikon Co., Ltd., Japan

แผ่นนับเม็ดเลือดแดง (Haemacytometer) รุ่น Neubauer Bright Line ของบริษัท Bocco Co., Ltd., Germany

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Rotary incubator shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., N.J. U.S.A

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบหมุน (Rotary incubator shaker) รุ่น G25 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., N.J. U.S.A

เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer) รุ่น Vortex-Genie No.2 ของบริษัท Scientific Industries Inc. U.S.A

เครื่องชั่งแบบละเอียด (Electronic balance) รุ่น FX-180 ของบริษัท A&D Co., Ltd., Japan

เครื่องชั่งแบบหยาบ (Electronic balance) รุ่น FX-3000 ของบริษัท A&D Co., Ltd., Japan

เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น KT-30 SD ของบริษัท ALP Co., Ltd., Japan

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น PHM 82 ของบริษัท Radiometer Copenhagen Denmark

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bousch & Lomb U.S.A

เครื่องระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator) RE 52 ของบริษัท Yamato Scientific Co., Ltd., Japan

เครื่องกลั่นหาไนโตรเจน (Unit distillation) รุ่น Buchi 315 ของบริษัท Laboratoriums-Technik AG Co., Ltd., Switzerland

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography) Shimadzu LC-6A ของบริษัท Shimadzu Co., Ltd., Japan

ปั๊มไหลวนชนิดเพอริสตอลติก (Peristaltic pump) รุ่น P-3 ของบริษัท Pharmacia Fine Chemical U.S.A

ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar flow hood) รุ่น NK System Clean Bench Japan

ตู้อบแห้ง (Oven) รุ่น UL-80 ของบริษัท Memmert Co., Ltd., Germany

ถังหมัก (Fermentor) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MD 300-5L พร้อมใบพัดแบบเทอร์ไบน์ (Turbine impeller) และชุดควบคุมภาวะ (Bioprocess controller) รุ่น MDIAC-SS ของบริษัท Marubishi, Tokyo, Japan เครื่องอัดอากาศ (Air compressor) ของบริษัท Hitachi, Japan เครื่องควบคุมระบบน้ำหล่อเย็น (Circulation type hardy cooler) รุ่น TRL-108 ของบริษัท Thomas Kagaka, Japan

มาตรตรวจวัดความเป็นกรดด่าง (pH combination electrode) รุ่น D-26 และมาตรวัดออกซิเจนที่ละลาย (Dissolved oxygen electrode) รุ่น OE-8270G ของบริษัท TOA Electronics Ltd., Japan

2.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ	เกรด
กรดจิบเบอเรลลิก (GA_3) มาตรฐาน	Sigma	สหรัฐอเมริกา	Analytical
กรด 3,5ไดไนโตรซาลิไซลิก	Sigma	สหรัฐอเมริกา	Analytical
กรดฟอสฟอริก	Carlo Erba	อิตาลี	Analytical
กรดอะซิติก	Merck	เยอรมัน	Analytical
กรดบอริก	Merck	เยอรมัน	Analytical
กรดซัลฟูริก	Merck	เยอรมัน	Lab
กรดไฮโดรคลอริก	Merck	เยอรมัน	Lab
3-อะเซตาไมโดฟีนอล	Sigma	สหรัฐอเมริกา	Analytical
คอปเปอร์ซัลเฟต	Merck	เยอรมัน	Lab
โซเดียมอะซิเตท	Carlo Erba	อิตาลี	Analytical
โซเดียมไฮดรอกไซด์	Merck	เยอรมัน	Lab
ซิงค์คลอไรด์	Merck	เยอรมัน	Lab
ซูโครส	Sigma	สหรัฐอเมริกา	Analytical
เดกซ์โทรส	สงวนชัยเคมี	ไทย	Commercial
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	Carlo Erba	อิตาลี	Lab
โพแทสเซียมโซเดียมทาเทรต	Merck	เยอรมัน	Analytical
โพแทสเซียมซัลเฟต	Merck	เยอรมัน	Lab

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมทธิลแอลกอฮอล์	Carlo Erba	อิตาลี	Analytical
แมกนีเซียมซัลเฟต	Fluka	สวิสเซอร์แลนด์	Lab
วุ้นผง	พัฒนสินเอ็นเตอร์ไพรส์	ไทย	Commercial
น้ำตาลทราย (ซูโครส)	มิตรผล	ไทย	Commercial
น้ำมันถั่วเหลือง	ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช	ไทย	Commercial
กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันแล้ว	อุตสาหกรรมวิวัฒน์	ไทย	Commercial
อะลูมิเนียมออกไซด์	BDH Chemical	อังกฤษ	Lab
แอมโมเนียมไนเตรท	AJAK Chemical	ออสเตรเลีย	Lab
แอมโมเนียมซัลเฟต	Carlo Erba	อิตาลี	Lab
เอทานอล 95%	กรมสรรพสามิต	ไทย	Commercial
เอนไซม์อินเวอร์เทส	Wako Pure Chemical	ญี่ปุ่น	Analytical

2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อ *Gibberella fujikuroi* N9-34 ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์โดยจันทร์ธิรา ลัภยพร (2536) และได้ทำการศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดยศุภชัย สมัปปิโต (2537)

2.3 วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

เขี่ยเส้นใยของของเชื้อ *Gibberella fujikuroi* N9-34 โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลากบนอาหารแข็งเอียง (slant agar) โพเตโตเด็กซ์โทรสอาการ์เสริมแร่ธาตุ (potato dextrose agar,PDA) (ภาคผนวก ก.1) ที่อยู่ในหลอดทดลองบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

2.4.1 การเตรียมสปอร์

เขี่ยเส้นใยของเชื้อ *Gibberella fujikuroi* N9-34 ลงบนอาหารแข็งเอียงอะซิเตต (acetate agar slant) (ภาคผนวกที่ ก.2) ที่อยู่ในหลอดทดลอง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้หลอดไฟที่มีความเข้มแสง 9,840 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใช้เข็มเขี่ยสปอร์ให้ทั่ว และกระจายสปอร์ในน้ำให้เป็นสปอร์แขวนลอยด้วยเครื่องเขย่า (vortex mixer) กรองสปอร์แขวนลอยที่ได้ผ่านผ้าขาวบางที่ซ้อนทับกันหนา 5 ชั้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นับจำนวนสปอร์แขวนลอยโดยใช้แผ่นนับเม็ดเลือดแดง (haemacytometer) ถ้าในกรณีที่ใช้เชื้อที่เก็บ

ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสมาเลี้ยงจะต้องนำเชื้อไปเลี้ยงในอาหารแข็งเอียงโพเตโตเด็กซ์โทรสอาการ์เสริมแร่ธาตุ (potato dextrose agar,PDA) (ภาคผนวก ก.1) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เส้นใยเจริญเต็มที่ จึงนำมาใช้เพื่อเตรียมสปอร์ตามวิธีข้างต้น

2.4.2 การเตรียมหัวเชื้อในระดับขวดเขย่า และในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

นำสปอร์แขวนลอยจากข้อ 2.4.1 จำนวน 10^6 สปอร์ ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวกที่ ก.3) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (rotary incubator shaker) ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที

2.4.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

2.4.3.1 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในระดับขวดเขย่า

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 2.4.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก (ภาคผนวก ก.4) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกวันจนครบ 10 วัน นำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 2.6

2.4.3.2 การเลี้ยงเพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อตามข้อ 2.4.2 ให้ได้ปริมาตร 350 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก (ภาคผนวก ก.4) ปริมาตร 3,150 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 7 ไม่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการหมัก และใช้อะดีคานอล (adecanol) เป็นสารต่อต้านการเกิดฟอง เก็บตัวอย่างทุกวันครั้งละ 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 วัน นำมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก หาน้ำหนักเซลล์แห้ง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 2.6

2.5 วิธีการทดลอง

2.5.1 ศึกษาปัจจัยของสารอาหารที่มีผลต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในระดับขวดเขย่า

ทดลองหาปริมาณแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก โดยการเลี้ยงเชื้อ *Gibberella fujikuroi* N9-34 ในสูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก (ภาคผนวก ก.4) ที่มีการแปรปริมาณซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เป็น 80, 100, และ120 กรัมต่อลิตร และแปรปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 1.31, 1.49, 1.68, และ1.89 กรัมต่อลิตร และใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนเป็นกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วปริมาณ 5.9 กรัมต่อลิตร แล้วทำการบ่มบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 10 วัน นำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 2.6

2.5.2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบแบตช์

เตรียมสปอร์แขวนลอยตามข้อที่ 2.4.1 นำมาใช้ในการเตรียมหัวเชื้อตามข้อที่ 2.4.2 แล้วนำมาใช้ในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกตามข้อที่ 2.4.3.2 ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำตัวอย่างมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในระดับถังหมัก กับในระดับขวดเขย่า

2.5.2.1 ศึกษาผลของอัตราส่วนโดยมวลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

จากผลการทดลองในขั้นตอนที่ 2.51 เลือกใช้ปริมาณซูโครสที่ให้ผลผลิตเซลล์ และกรดจิบเบอเรลลิกในปริมาณที่สูงมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อในระดับถังหมัก และแปรปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นแตกต่างกัน ได้แก่ 1.49, 1.68, และ1.89 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นค่าอัตราส่วนโดยมวลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 88, 81 และ71 ตามลำดับ เก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 10 วัน นำตัวอย่างมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก เลือกค่าอัตราส่วนโดยมวลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ประสิทธิภาพการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกดีที่สุดมาใช้ทำการทดลองต่อไป

2.5.2.2 ศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักที่มีต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

ทำการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในสูตรอาหารที่มีอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 2.5.2.1 โดยทำการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (dissolved oxygen) เป็น 20 และ 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัวตลอดระยะเวลาการหมัก โดยกำหนดอัตราการกวนเริ่มต้น 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีตลอดการทดลอง ขณะที่ควบคุมปริมาณออกซิเจนทำโดยควบคุมอัตราการกวนเป็นแบบอัตโนมัติ เก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 10 วัน นำตัวอย่างมาวัดค่าความ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก

2.5.3 ศึกษาการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์

2.5.3.1 ศึกษาผลของระดับน้ำตาลที่ควบคุมในระหว่างการหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้กระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้จากการศึกษาในข้อ 2.5.2 โดยช่วงแรกทำการหมักแบบแบตช์จนกระทั่งปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงต่ำกว่าระดับที่ต้องการควบคุมจึงทำการเติมน้ำตาลความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยแปรระดับน้ำตาลที่ต้องการควบคุมในระหว่างการหมักเป็น 40, 50, และ60 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก

2.5.3.2 ศึกษาการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกเมื่อทำการควบคุมระดับน้ำตาล และเติมสารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนลงไปในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้กระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ที่มีการควบคุมระดับน้ำตาลที่เหมาะสมในระหว่างการหมักจากข้อ 2.5.3.1 แล้วเติมสารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรในวันที่ 7 ของการหมัก โดยทำการควบคุมให้มีปริมาณไนโตรเจนในน้ำหมักเท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตรซึ่งคิดเป็นประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณไนโตรเจนในอาหารเริ่มต้น นำตัวอย่างมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก เพื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบเฟดแบตช์ที่มีการเติมสารอาหารแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

2.6 วิธีการวิเคราะห์

2.6.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำหมักปริมาตร 20 มิลลิลิตร มากรองผ่านกระดาษกรองวัตต์แมน GF/C ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนล้างเส้นใยบนกระดาษกรองด้วยน้ำขจัดไอออนนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจนน้ำหนักคงที่ ทิ้งให้เย็นใน desiccator นำไปชั่งน้ำหนัก และหักลบน้ำหนักกระดาษกรองจะได้น้ำหนักเซลล์แห้ง

2.6.2 การหาค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก

วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก ด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (total sugar) โดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทสในอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 4 ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข.2) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม จากนั้นนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิก (ภาคผนวก ข.2) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำตัวอย่างที่ได้ไปต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 10 นาที และทำให้เย็นทันทีแล้วเติมน้ำขจัดไอออนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครส

กราฟมาตรฐานใช้สารละลายซูโครสมาตรฐานเข้มข้น 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำขจัดไอออนเป็นตัวเปรียบเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณน้ำตาลซูโครสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 ตามภาคผนวก ค.1

2.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธีของ Kjeldahl (Steyermark, 1951)

ชั่งของผสมของตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst mixture) (ภาคผนวก ข.3.1) ปริมาณ 7 กรัม ใส่ในขวดกลั่นขนาด 300 มิลลิลิตร เติมตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดกำมะถันปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุมด้วยเครื่อง Buchi 425 ในตู้ดวันจนได้สารละลายใสสีเขียว ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำขจัดไอออนปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการกลั่นจับแอมโมเนียมที่เกิดขึ้น โดยใช้สารละลายกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีอินดิเคเตอร์ (ภาคผนวก ข.3.2) จำนวน 2-3 หยด กลั่นจนกระทั่งสารละลายกรดบอริกมีปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน 0.1 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริก

โดยที่ร้อยละของไนโตรเจนทั้งหมด = (A-B) x N x 1.4

เมื่อ A = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเตรทกับตัวอย่าง

B = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเตรทกับแบลงค์

N = ความเข้มข้น (นอร์มอล) ของกรดไฮโดรคลอริก

2.6.5 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก โดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (HPLC) ตามวิธีของอรไท สุขเจริญ (2533)

เตรียมสารตัวอย่างของกรดจิบเบอเรลลิกโดยนำตัวอย่างน้ำหมักมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 3.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร เติม 3-อะเซตาไมโดฟีนอล (3-Acetamidophenol) เข้มข้น 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในปริมาตร 40 ไมโครลิตร จากนั้นสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตตปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องผสมนาน 4 นาที ทิ้งให้สารแยกชั้น นำชั้นเอทธิลอะซิเตตมาเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสเพื่อขจัดน้ำ นำสารละลายที่ได้มา 3 มิลลิลิตร มาระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วนำมาละลายด้วยสารละลายตัวพาปริมาตร 3 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตต ฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตรเข้าเครื่อง HPLC โดยมีภาวะดังนี้

คอลัมน์	:	Spherisorb 5 C8 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ยาว 250 มิลลิลิตร
สารละลายตัวพา	:	สารละลายเมธานอลในน้ำปราศจากไอออน (DDI) ที่ปรับค่าพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดฟอสฟอริก ในอัตราส่วน 35 ต่อ 65
อัตราการไหลของสารละลายตัวพา	:	1 มิลลิลิตรต่อนาที
ความดัน	:	ประมาณ 180-200 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร
การตรวจวิเคราะห์	:	วัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 208 นาโนเมตร
ความไวของเครื่องตรวจวัด	:	0.08 AUFS (absorbance unit full scale)
เวลาที่สารอยู่ในคอลัมน์ (retention time)	:	8-10 นาที

คำนวณหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกจากกราฟมาตรฐานของกรดจิบเบอเรลลิกในช่วงความเข้มข้น 0.2-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ซึ่งกราฟมาตรฐานที่ใช้นั้นเป็นกราฟระหว่างความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิก กับอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของกรดจิบเบอเรลลิกต่อสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (ภาคผนวก ค.2)