วิธีการทดลอง

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการย่อยสลายไขมันของไลเปส

เป็นการศึกษาเปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายไขมันของไลเปสที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงคือ สายพันธุ์ PTL36, PTL38, PTL41 และ PTL44 (ปราณี, 2548)

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นโดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium A ซึ่งประกอบด้วย basal salt solution (Atlas, 1995), 0.1 % w/v ยีสต์สกัดและ 1 % v/v น้ำมันมะกอก บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อ (OD_{600}) เท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium A จากนั้นปิเปตหัวเชื้อตั้งต้นที่เจือจางแล้ว (5% v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ซึ่งประกอบด้วย basal salt solution, 0.5 % w/v ยีสต์สกัดและ 1 % v/v น้ำมันมะกอก โดยปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 ด้วย 0.1 M HCl หรือ NaOH นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วทำการแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 19,000 x*g* เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาทดสอบกิจกรรมและความคงทนดังนี้

1.1 พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปส

ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของไลเปส โดยนำสารละลายไลเปสมาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอชระดับต่างๆ คือ 4.0 4.6 5.0 5.6 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.50 และ 9.0 แล้วนำมาหากิจกรรมไลเปส (Odera *et al.*, 1986)

1.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปส

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมไลเปส โดยนำสารละลายไลเปสมาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 1.1 แล้วนำมาหากิจกรรมไลเปสที่อุณหภูมิ 40 45 50 55 60 65 และ 70 องศาเซลเซียส

1.3 ผลของพีเอชต่อความคงทนของไลเปส

ศึกษาผลของพีเอชต่อความคงทนของไลเปส โดยนำสารละลายไลเปสมาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอชระดับต่างๆ คือ 4.0 4.6 5.0 5.6 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.50 และ 9.0 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที แล้วนำมาหากิจกรรมไลเปส โดยบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 1.2

1.4 ผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของไลเปส

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของไลเปส โดยนำสารละลายไลเปส 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิระดับต่างๆ คือ 30 40 50 60 และ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหากิจกรรมไลเปส โดยใช้พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 1.1 และบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 1.2

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อการผลิตไลเปส

2.1 พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นโดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium A ซึ่งประกอบด้วย basal salt solution (Atlas, 1995), 0.1 % w/v ยีสต์สกัดและ 1 % v/v น้ำมันมะกอก บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อ(OD_{600}) เท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium A จากนั้นปิเปตหัวเชื้อตั้งต้นที่เจือจางแล้ว (5% v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ซึ่งประกอบด้วย basal salt solution, 0.5 % w/v ยีสต์สกัดและ 1 % v/v น้ำมันมะกอก โดยปรับพีเอช เท่ากับ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ด้วย 0.1 M HCl หรือ NaOH นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วทำการแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 19,000 x*g* เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส

2.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นเช่นเดียวกับข้อ 2.1 จากนั้นปิเปตหัวเชื้อตั้งต้นที่เจือจางแล้ว (5% v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B โดยปรับพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 45, 55 และ 60 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้ว ทำการแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 19,000 x*g* เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส

2.3 ช่วงอายุของหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสม

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium A เช่นเดียวกับข้อ 2.1 บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลาต่างๆ คือ 18, 24, 30, 36, 42 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตหัวเชื้อตั้งต้นที่เจือจางแล้ว (5% v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B โดยปรับพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วทำการแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 19,000 x*g* เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส

2.4 ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสม

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นในช่วงอายุของหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมจากข้อ 2.3 จากนั้นปิเปตหัวเชื้อตั้งต้นที่เจือจางแล้วในปริมาตร 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 และ 9.0% v/v ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B โดยปรับพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วทำการแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 19,000 x*g* เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส

2.5 อัตราการเขย่าให้อากาศที่เหมาะสม

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นในช่วงอายุของหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมจากข้อ 2.3 จากนั้นปิเปตหัวเชื้อตั้งต้นที่เจือจางในปริมาตรที่เหมาะสมจากข้อ 2.4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B โดยปรับพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบในระดับต่างๆ คือ 100, 150, 180 และ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วทำการแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 19,000 xg เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส

2.6 ช่วงเวลาที่เชื้อสังเคราะห์ไลเปสในปริมาณสูง

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นในช่วงอายุของหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมจากข้อ 2.3 จากนั้นปิเปตหัวเชื้อตั้งต้นที่เจือจางแล้วปริมาตรที่เหมาะสมจากข้อ 2.4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B โดยปรับพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบที่เหมาะสมจากข้อ 2.5 เป็นเวลา 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วตามช่วงเวลาต่างๆ ให้ทำการแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 19,000 xg เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส

2.7 ชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสม

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นในช่วงอายุของหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมจากข้อ 2.3 จากนั้นปิเปตหัวเชื้อตั้งต้นที่เจือจางแล้วปริมาตรที่เหมาะสมจากข้อ 2.4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B แต่มีสับสเตรท (1% v/v) แตกต่างกันคือ 1). น้ำมันพืชประกอบอาหารที่ผลิตเชิงพาณิชย์ (ใหม่) และ 2). น้ำมันพืชประกอบอาหารที่ผลิตเชิงพาณิชย์ (ผ่านการใช้แล้ว) ซึ่งได้แก่ น้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าวโพด น้ำมันรำข้าว น้ำมันปาล์มโอรีนโดยปรับพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบที่เหมาะสมจากข้อ 2.5 บ่มในช่วงเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 2.6 เมื่อครบกำหนดแล้วทำการแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 19,000 xg เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส

2.8 ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสับสเตรท

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นในช่วงอายุของหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมจากข้อ 2.3 จากนั้นปิเปตหัวเชื้อตั้งต้นที่เจือจางแล้วปริมาตรที่เหมาะสมจากข้อ 2.4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B ที่มีสับสเตรทที่เหมาะสมจากข้อ 2.7 แต่มีระดับความเข้มข้นในระดับต่างๆ คือ 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 (% v/v) โดยปรับ พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบที่เหมาะสมจากข้อ 2.5 บ่มในช่วงเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 2.6 เมื่อครบกำหนดแล้ว ทำการแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 19,000 xg เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3. การผลิตไลเปสโดยการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Submerge fermentation)

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นในช่วงอายุของหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.3 จากนั้นปิเปตหัวเชื้อตั้งต้นที่เจือจางแล้วปริมาตรที่เหมาะสมจากข้อ 2.4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร) ที่มีชนิดของสับสเตรทในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 2.7 และ 2.8 โดยปรับพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบที่เหมาะสมจากข้อ 2.5 บ่มในช่วงเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 2.6 เมื่อครบกำหนดแล้ว ทำการแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 19,000 x*g* เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส

4. การเตรียมซัสเพ็นท์ชันของเซลล์แบคทีเรียและสารละลายไลเปสเพื่อการตรึงรูป

4.1 การเตรียมซัสเพ็นท์ชันของเซลล์แบคทีเรีย

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นในช่วงอายุของหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.3 จากนั้นปิเปตหัวเชื้อตั้งต้นที่เจือจางแล้วปริมาตรที่เหมาะสมจากข้อ 2.4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร) ที่มีชนิดของสับสเตรทในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 2.7 และ 2.8 โดยปรับพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบที่เหมาะสมจากข้อ 2.5 บ่มในช่วงเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 2.6 เมื่อครบกำหนดแล้ว ทำการแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 19,000 x*g* เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้ละลายใน 0.2 M phosphate buffer pH 7.0 โดยใช้อัตราส่วนตะกอนเซลล์ต่อสารละลายบัฟเฟอร์เท่ากับ 1.5 : 12.5 (w/v) ส่วนนี้คือ ซัสเพ็นท์ชันของเซลล์แบคทีเรีย

4.2 การเตรียมสารละลายไลเปส

1). การเตรียมสารละลายอินตราเซลลูลาไลเปส

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นในช่วงอายุของหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมจากข้อ 2.3 จากนั้นปิเปตหัวเชื้อตั้งต้นที่เจือจางแล้วปริมาตรที่เหมาะสมจากข้อ 2.4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร) ที่มีชนิดของสับสเตรทในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 2.7 และ 2.8 โดยปรับพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบที่เหมาะสมจากข้อ 2.5 บ่มในช่วงเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 2.6 เมื่อครบกำหนดแล้ว ทำการแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 19,000 x*g* เป็นเวลา 10 นาที สารละลายส่วนใสที่ได้คือ อินตราเซลลูลาไลเปส

2). การเตรียมสารละลายเอ็กซ์ตราเซลลูลาไลเปส

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นในช่วงอายุของหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมจากข้อ 2.3 จากนั้นปิเปตหัวเชื้อตั้งต้นที่เจือจางแล้วปริมาตรที่เหมาะสมจากข้อ 2.4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร) ที่มีชนิดของสับสเตรทในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 2.7 และ 2.8 โดยปรับพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบที่เหมาะสมจากข้อ 2.5 บ่มในช่วงเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 2.6 เมื่อครบกำหนดแล้ว ทำการแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยง

ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 19,000 xg เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้ละลายใน 0.2 M phosphate buffer pH 7.0 โดยใช้อัตราส่วนตะกอนเซลล์ต่อสารละลายบัฟเฟอร์เท่ากับ 1.5 : 12.5 (w/v) นำซัสเพ็นท์ชันของเซลล์แบคทีเรียที่ได้ไปเข้าเครื่องทำให้เซลล์แตกด้วยเสียง (sonicator) เป็นเวลา 30 นาที ทำการแยกเศษเซลล์ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 19,000 xg อุณหภูมิ 4 ^{0}C เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสมากรองผ่านแผ่นกรอง (Milipore) ขนาด 0.45 ไมครอน สารละลายส่วนใสที่ได้คือ เอ็กซ์ตราเซลลูลาไลเปส

5. การตรึงเซลล์แบคทีเรียและไลเปสบนวัสดุดูดซับ

ในที่นี้จะใช้เปลือกไข่เป็นวัสดุดูดซับตามวิธีของ (Vemuri *et al.*, 1998) โดยนำเปลือกไข่มาบดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปต้มในสารละลาย SDS เป็น เวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นและอะซิโตน ปล่อยทิ้งให้แห้ง จากนั้นนำไปแช่ในซัสเพ็นท์ชั่นของเซลล์แบคทีเรียหรือสารละลายไลเปสที่เตรียมไว้ในข้อ 4 (โดยใช้อัตราส่วน 12.5 มิลลิลิตรต่อเปลือกไข่ 50 กรัม) เมื่อมีการดูดซับหมดแล้ว ปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้วล้างด้วย 2% glutaraldehyde ปล่อยให้แห้งในอากาศ เก็บเปลือกไข่ที่ตรึงเซลล์แบคทีเรียไว้ในภาชนะปลอดเชื้อ เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

6. การย่อยไขมันโดยเซลล์แบคทีเรียตรึงรูปและไลเปสตรึงรูป

6.1 การย่อยไขมันด้วยเซลล์แบคทีเรียตรึงรูป

นำเซลล์แบคทีเรียตรึงรูปบนเปลือกไข่มาใส่ใน Olive oil medium (ปริมาตร 150 มิลลิลิตรในฟลาส์ก ขนาด 250 มิลลิลิตร) ซึ่งประกอบด้วย basal salt solution และ 2.0 % v/v emulsion olive oil บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เก็บสารละลายส่วนใสตามช่วงเวลาต่าง ๆ ไปวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยวิธี partition-gravimetric method (Kirschman and Pomeroy, 1949)

6.2 การย่อยไขมันด้วยไลเปสตรึงรูป

นำไลเปสตรึงรูปบนเปลือกไข่มาใส่ใน phosphate buffer medium (ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในฟลากส์ ขนาด 250 มิลลิลิตร) ซึ่งประกอบด้วย phosphate buffer, pH 5.6 และ 2.0 % v/v emulsion olive oil (ในอัตราส่วนของ phosphate buffer: olive oil =1:1) บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เก็บสารละลายส่วนใสตามช่วงเวลาต่าง ๆ ไปวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยวิธี partition-gravimetric method (Kirschman and Pomeroy, 1949)

7. การบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมันด้วยไลเปสตรึงรูป

นำไลเปสตรึงรูปบนเปลือกไข่มาใส่ในในตัวอย่างน้ำเสีย (น้ำเสียสังเคราะห์และน้ำเสียจากโรงงานผลิตเนื้อสัตว์เทศบาลวารินชำราบ) (ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในฟลากส์ ขนาด 250 มิลลิลิตร) อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างที่ช่วงเวลาต่าง ๆ เพื่อนำไป

วิเคราะห์ค่า BOD โดยวิธี azide method (Helrich, 1990) และหาปริมาณไขมันโดยวิธี partition-gravimetric method

8. การตรวจวินิจฉัยชนิดของแบคทีเรียโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

เป็นการศึกษาเพื่อให้ทราบถึงชนิดหรือชื่อวิทยาศาสตร์ของแบคทีเรียที่สังเคราะห์ไลเปส โดยอาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อเพิ่มจำนวน rDNA gene ด้วยปฏิกิริยาโพลีเมอร์เรสเชนรีเอกชั่น (Polymerase Chain Reaction; PCR) โดยเตรียมสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย crude cell lysate, primer pairs pA/pH′, deoxynucleoside triphosphate, *Taq* DNA polymerase และ PCR buffer อุณหภูมิที่ใช้สำหรับปฏิกิริยาคือ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวนปฏิกิริยาเท่ากับ 35 รอบ นำสารละลาย PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ และนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบส (sequencing) แล้วนำมาเปรียบเทียบกับ 16S rRNA gene sequence ในฐาน ข้อมูลของ EMBL database โดยใช้ BLAST search