# บทที่ 3

# ระเบียบวิธีวิจัย

## 3.1 อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

### 3.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้

1. ตู้สำหรับเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ (Astec Microflow Model ABS 1200, Bioquell Medical Ltd., UK)
2. ตู้บ่มเชื้อพร้อมเครื่องเขย่า (Infors AGCH-4103, Bottmingen Ltd., Switzerland)
3. หม้อนึ่งความดันไอ (Tomy SX-700, Japan)
4. เครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสง (UV-visible spectrophotometer Shimadzu Model UV-160, Japan)
5. เครื่องปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง (Kubota 5922, USA)
6. อ่างน้ำร้อนพร้อมเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, Japan)
7. เครื่องตรวจวัดค่าพีเอช (pH meter, model 420A, Origin research Inc., USA)
8. ชุดเครื่องมือ Fraction collector
9. เครื่อง HPLC (C-R14 Chromatopac, Shimadzu, Japan)
10. เครื่อง GC (Shimadzu, Japan)
11. เครื่อง PCR (Bio-Rad, T 100 $^{TM}$, Thermal cycle)
12. เครื่อง free dryer (FreeZone$^{6}$, Labconco corporation, Missouri)
13. Vortex mixer (Vortex-genie2, Scientific Industries Inc., USA)
14. Stirrer (PMC, Barnstead/Thermolyne, USA)
15. Speed vacuum (Univapo 100ECH, Uniquip, Germany)
16. Desiccators
17. นาฬิกาจับเวลา
18. ตู้อบแห้ง (Eyela NDD-600 ND hot air oven, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan)
19. อุปกรณ์และเครื่องมือพื้นฐานอื่นๆ ในห้องปฏิบัติการด้านเทคโนโลยีชีวภาพและเทคโนโลยีชีวเคมี

### 3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Adipic acid (Sigma Chemical, 124-04-9)
2. Agar (Difco Laboratories)
3. Ammonium chloride (Loba Chemie)
4. Ammonium molybdate (Carloerba Co., Ltd)
5. Birchwood xylan (Sigma Chemical, X0502)
6. Bovine serum albumin (Fluka Chemical)
7. Calcium carbonate (Carloerba Co., Ltd)
8. Calcium chloride (Carloerba Co., Ltd)
9. D (+) Glucose (Merck KGaA)
12. Ethidium bromide (Amresco)
13. Ethanol (Carloerba Co., Ltd)
14. Fumaric acid (Sigma Chemical, 110-17-8)
15. Folin-ciocalteu's reagent (Merck KGaA)
16. Glycerol (Carloerba Co., Ltd)
17. Hydrochloric acid (Carloerba Co., Ltd)
18. Itaconic acid (Sigma Chemical, 97-65-4)
19. Magnesium sulphate (Carloerba Co., Ltd)
20. Malic acid (Sigma Chemical, 97-67-6)
21. Methanol (Carloerba Co., Ltd)
22. Peptone (Himedia)
23. Sodium chloride (Ajax Chemical)
24. Succinic acid (Sigma Chemical, 110-15-6)
25. Standard molecular mass maker (Pierce Co., Ltd)
26. Sulfuric acid (Carloerba Co., Ltd)
27. Water HPLC grade (RCI labscan limited)
28. D (-) xylose Merck KGaA)
29. Yeast extract (Himedia)

## 3.2 ระเบียบวิธีวิจัย

### 3.2.1 การเก็บตัวอย่างเพื่อคัดแยกแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างจากดิน (S) 126 ตัวอย่าง กองใบไม้ (LK) 41 ตัวอย่าง และดอกไม้ (FM) 29 ตัวอย่าง ภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี พื้นที่การศึกษาบางขุนเทียน และ ผลไม้เน่าเสีย (BF) 35 ตัวอย่าง น้ำผลไม้ (BW) 27 ตัวอย่าง ผักเน่าเสีย (BV) 46 ตัวอย่าง อาหารดอง (BD) 38 ตัวอย่าง และลูกแป้งข้าวหมาก (DM) 24 ตัวอย่าง จากตลาดสี่มุมเมืองจังหวัดปทุมธานี และตัวอย่างดินจากโรงงานน้ำตาลจังหวัดราชบุรี (ML) 35 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 401 ตัวอย่าง

### 3.2.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน

#### 3.2.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast extract peptone xylose (YPX) ประกอบด้วย yeast extract ร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร peptone ร้อยละ 2 น้ำหนัก/ปริมาตร และสารละลายน้ำตาลไซโลสที่มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร โดยเติมกรดโพพิออกนิกร้อยละ 0.01 ปริมาตร/ปริมาตร เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร หลังจากฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอจนกระทั่งอาหารเย็น

#### 3.2.2.2 การคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน

เติมตัวอย่างจากข้อ 3.2.1 ประมาณ 1 กรัม ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อที่ 3.2.2.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของจุลินทรีย์ (ทำซ้ำ 2-3 รอบ) เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยดูจากความขุ่นของอาหาร จากนั้นนำมาคัดแยกโคโลนีเดี่ยวด้วยวิธี cross-streak บนอาหารแข็ง YPX ที่มีน้ำตาล

ไซโลสความเข้มข้นสุดท้าย 10 ปริมาตร/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียลส เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

### 3.2.3 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดอินทรีย์จากน้ำตาลไซโลสในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด

นำแบคทีเรียที่สามารถเจริญในอาหาร YPX ที่มีน้ำตาลไซโลสเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนได้จากข้อ 3.2.2.2 นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal พีเอช 7.0 (Takeshi และคณะ 1981) ประกอบด้วย yeast extract ร้อยละ 0.1 น้ำหนัก/ปริมาตร $NH_4Cl$ ร้อยละ 0.3 น้ำหนัก/ปริมาตร $MgSO_4.7H_2O$ ร้อยละ 0.05 น้ำหนัก/ปริมาตร $KH_2PO_4$ ร้อยละ 0.05 น้ำหนัก/ปริมาตร โดยมีน้ำตาลไซโลสเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ความเร็ว 250 รอบ/นาที คัดแยกตัวอย่างที่มีการเจริญเติบโต (อาหารขุ่น) และมีค่า พีเอชในอาหารต่ำกว่าพีเอช 5.0 ถ่ายลงอาหารเหลว Basal ชนิดเดียวกัน 2-3 รอบ

### 3.2.4 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดมาลิกและตรวจสอบด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

นำตัวอย่างที่ตรวจพบการเจริญของแบคทีเรียและมีค่าพีเอชในอาหารต่ำกว่าพีเอช 5.0 มาคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอินทรีย์ มาทดสอบการสร้างบริเวณใส ( clear zone) บนอาหารแข็ง Basal ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร นำไอโซเลทที่สร้างบริเวณใส (clear zone) ขนาดใหญ่รอบโคโลนี โดยวัดค่าจาก Clear zone/Colony มาทดสอบการผลิตกรดอินทรีย์โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยมีน้ำตาลไซโลสเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเชื้อตั้งต้นปริมาตรร้อยละ 5 ปริมาตร/ปริมาตร โดยปรับปริมาตรเซลล์ให้มีค่า optical density ($OD_{600}$) ประมาณ 0. 5 ($38 \times 10^{-8}$ CFU/mL) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Aminex ® HPX-87H Column ( 300x7.8 mm) อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิ

คอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส วัฏภาคเคลื่อนที่คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.005 โมล และใช้ UV-VISIBLE เป็น detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

### 3.2.5 การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาและพิสูจน์เอกลักษณ์ของจุลินทรีย์

#### 3.2.5.1 การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยา

นำจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดมาลิกได้สูงสุดจากข้อ 3.2.4 มาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็ง และนำไปย้อมแกรมตามวิธี Begey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath, 1986) และตรวจสอบลักษณะของโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์

#### 3.2.5.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

จำแนกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยเปรียบเทียบลำดับเบส 16S rRNA ที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย โดย 16S rRNA จะถูกเพิ่มจำนวนด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ด้วย เครื่อง DNA thermal cycle โดยใช้ 8F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) และ 1492R (5'ACGGCTACCTTGTTACGACTT) เป็น primers สำหรับโคลนยีน 16S rRNA และโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM T – easy และ Transfrom เข้าสู่ *Escherichia coli* DH5$\alpha$ แล้วสกัดพลาสมิด ส่งวิเคราะห์ลำดับเบสของจุลินทรีย์ที่คัดเลือก และเปรียบเทียบกับลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรียชนิดอื่น โดยใช้ฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BLAST ของ National Center of Biotechnology Information databases (NCBI databases)

### 3.2.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมาลิก

#### 3.2.6.1 การศึกษาผลของแคลเซียมคาร์บอเนต

ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมาลิกจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.4 โดยศึกษาผลของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เติมลงในอาหาร Basal medium ในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้น

ของน้ำตาลไซโลสร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร โดยเติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นต่างๆดังนี้ ร้อยละ 1, 5 และ 10 น้ำหนัก/ปริมาตร เปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

นำมาฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ เติมเชื้อตั้งต้น (Starter) ปริมาตรร้อยละ 5 ปริมาตร/ปริมาตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที เก็บผลการทดลองที่ระยะเวลาต่างๆ และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดมาลิกที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง HPLC ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าพีเอช และวัดความเจริญของแบคทีเรีย

**3.2.6.2 การศึกษาผลของน้ำตาลไซโลส**

ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมาลิกจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.4 โดยศึกษาผลของน้ำตาลไซโลสที่เติมลงในอาหารเหลว Basal ในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตที่สามารถผลิตกรดมาลิกมากที่สุดจากข้อ 3.1.6.1 โดยเติมน้ำตาลไซโลสความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ ร้อยละ 10, 15 และ 20 ปริมาตร/ปริมาตร

นำมาฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ เติมเชื้อตั้งต้น (Starter) ปริมาตรร้อยละ 5 ปริมาตร/ปริมาตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที เก็บผลการทดลองที่ระยะเวลาต่างๆ และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดมาลิกที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง HPLC ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าพีเอช และวัดความเจริญของแบคทีเรีย

**3.2.6.3 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน**

**3.2.6.3.1 ศึกษาผลของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน**

ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมาลิกจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.4 โดยศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน โดยเตรียมอาหารเหลว Basal เติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 3.1.6.1 และมีน้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนได้แก่ น้ำตาลไซโลส อะราบิโนส กลูโคส แมนโนส กาแลคโตส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร

นำมาฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ เติมเชื้อตั้งต้น (starter) ปริมาตรร้อยละ 5 ปริมาตร/ปริมาตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที เก็บผลการทดลองที่ระยะเวลาต่างๆ และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดมาลิกที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง HPLC ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าพีเอช และวัดความเจริญของแบคทีเรีย

**3.2.6.3.2 ศึกษาผลของพอลิเมอร์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน**

ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมาลิกจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.4 โดยเตรียมอาหารเหลว Basal เติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 3.1.6.1 ซึ่งมีไซแลนหรือเปลือกข้าวโพดที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน

นำมาฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ เติมเชื้อตั้งต้น (starter) ปริมาตรร้อยละ 5 ปริมาตร/ปริมาตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที เก็บผลการทดลองที่ระยะเวลาต่างๆ และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดมาลิกที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง HPLC ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าพีเอช และวัดความเจริญของแบคทีเรีย

### 3.2.7 การเก็บเซลล์เพื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ฟูมาเลสในส่วนของตะกอนเซลล์และ culture supernatant

เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.4 โดยเตรียมอาหารเหลว Basal เติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 3.1.6.1 และมีน้ำตาลไซโลสหรือกลูโคสเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที เก็บผลการทดลองที่ระยะเวลาต่างๆ จากนั้นแยกส่วนใส (culture supernatant) และส่วนตะกอน (pellet) ด้วยเครื่องปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส (culture supernatant) แล้วนำตะกอนเซลล์มาล้างด้วยสารละลาย Normal saline ร้อยละ 0.85 โดยปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอน ด้วยเครื่องปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อล้างโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อออก จากนั้นนำตะกอนเซลล์มาล้างด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS : sodium choride 0.15 โมลาร์ ใน potassium phosphate buffer 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ) และปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยสภาวะข้างต้น (ทำซ้ำจนกว่าส่วนใสที่ได้

ตรวจไม่พบโปรตีนด้วยวิธี Lowry) จากนั้นนำตะกอนเซลล์ที่ล้างแล้วมาละลายใน phosphate buffer saline พีเอช 7.4 และนำไปให้เซลล์แตกด้วยเครื่องโซนิเขตเตอร์ แล้วนำทั้งส่วนใส (culture supernatant) และโปรตีนจากตะกอนเซลล์หลังจากทำให้เซลล์แตกมาตรวจวัดปริมาณโปรตีน และตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ฟูมาเลส

**3.2.7.1 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ฟูมาเลสในส่วนของตะกอนเซลล์และ culture supernatant**

ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ฟูมาเลส โดยเติมเอนไซม์ฟูมาเลสปริมาตร 20 ไมโคลิตร ลงใน sodium fumarate เข้มข้น 10 มิล ลิโมลาร์ ปริมาตร 980 ไมโครลิตร ที่ละลายในในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และนำไปค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร โดยค่า coefficient เท่ากับ 0.109 $mM^{-1}CM^{-1}$ (Genda และคณะ, 2005)

## 3.2.8 การศึกษาการเพิ่มปริมาณกรดมาลิกด้วยกรดอินทรีย์

เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.4 โดยเตรียมอาหารเหลว Basal เติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 3.1.6.1 และมีน้ำตาลไซโลสเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน และเติมกรดอินทรีย์ต่างๆ ปริมาตรร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวเหนี่ยวการผลิตกรดมาลิกดังนี้ กรดไพรูวิก กรดซิตริก กรดไอโซซิตริก กรดไกออกซาลิก กรดซักซินิก กรดฟูมาลิก กรดออกซาโลอาซิติก และชุดการทดลองที่ไม่เติมกรดอินทรีย์เป็นชุดควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที เก็บผลการทดลองที่ระยะเวลาต่างๆ และไปวิเคราะห์ปริมาณกรดมาลิกด้วยเครื่อง HPLC และวัดการเจริญด้วยวิธีการวัดน้ำหนักแห้ง (ดัดแปลงจาก Zhang และคณะ, 2011a)

### 3.2.9 การศึกษาวิธีทำให้กรดอินทรีย์บริสุทธิ์และวิเคราะห์ชนิดของกรดอินทรีย์โดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

#### 3.2.9.1 การศึกษาวิธีทำให้กรดอินทรีย์บริสุทธิ์

ศึกษาการทำให้กรดอินทรีย์บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Aminex ® HPX-87H Column (300x7.8 mm) อุณหภูมิคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส วัฏภาคเคลื่อนที่คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.005 โมล และใช้ UV-VISIBLE เป็น detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร โดยใช้อัตราการไหล เท่ากับ 0.6 มิลลิลิตร/นาที เก็บ fraction ละ 150 ไมโครลิตร

#### 3.2.9.2 วิเคราะห์ชนิดของสารโดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

นำกรดอินทรีย์ตัวอย่างจากจุลินทรีย์ผลิตขึ้นมาผสมกับสารละลายกรดมาลิกมาตรฐานและนำไปวิเคราะห์ชนิดของกรดอินทรีย์ด้วยเครื่อง HPLC

### 3.2.10 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์อื่นๆ โดยเทคนิค Gas Chromatography (GC)

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ขากข้อ 3.2.4.1 ด้วยเครื่อง GC โดยใช้ flame ionization detector (FID) คอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสารคือ Carbopack B-DA/4% carbowax 20 M และใช้ carrier gas เป็นก๊าซไนโตรเจน โดยมีสารละลายมาตรฐานดังนี้ เอทานอล บิวทานอล กรดบิวทาริก กรดอะซิติก และ กรดโพพิโอนิก