บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟฟี (gas chromatography) รุ่น 3400CX ของบริษัท Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.2 แคปพิลลารี คอลัมน์ (capillary column) ชนิด CP-WAX 52 CB เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มม. ความยาว 60 ม.ของบริษัท Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.3 เครื่องผลิตก๊าซไฮโดรเจน (hydrogen generator) รุ่น 9200 ของบริษัท Packard ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.4 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psychotherm incubator shaker) รุ่น G27 แบบ rotary ของบริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.5 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น A200S ของบริษัท Sartorious ประเทศเยอรมณี

3.1.6 เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น L2200P ของบริษัท Sartorious ประเทศเยอรมณี

3.1.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KS-3000P ของบริษัท Kubota ประเทศญี่ปุ่น

3.1.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ รุ่น Centrikon T-42Kของบริษัท Kubota ประเทศญี่ปุ่น

3.1.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (VIS spectrophotometer) รุ่น Novaspec II ของบริษัท Pharmacia Biotech ประเทศอังกฤษ และหลอดใส่ตัวอย่าง (cuvette)

3.1.10 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 2000 ของบริษัท Cyberscan ประเทศสิงคโปร์

3.1.11 ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124ของบริษัท ISSCO ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.12 ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UL-60 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมณี

3.1.13 ตู้อบแห้ง (dryer oven) รุ่น UL-80 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมณี

3.1.14 หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท Tomy ประเทศญี่ปุ่น

3.1.15 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W760 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมณี

3.1.16 ไมโครปิเปตและทิปขนาด 100 200 1,000 และ 5,000 มล.

3.1.17 ถังหมัก (fermentor) ขนาด 5 ลิตร ของบริษัท B.E. Marubishi ประเทศญี่ปุ่น

3.2 เคมีภัณฑ์

3.2.1 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4)

3.2.2 กรดซิตริก ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)

3.2.3 กรดบอริก (H_3BO_3)

3.2.4 กรดเบนโซอิก ($C_7H_6O_2$)

3.2.5 คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$)

3.2.6 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)

3.2.7 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)

3.2.8 โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)

3.2.9 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)

3.2.10 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

3.2.11 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3.2.12 โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl)

3.2.13 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)

3.2.14 นิกเกิลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)

3.2.15 น้ำตาลทราย

3.2.16 น้ำอ้อย

3.2.17 แบคโตทริปโตส (Bacto tryptose)

3.2.18 ผงวุ้น

3.2.19 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)

3.2.20 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

3.2.21 เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)

3.2.22 เมทานอล (CH_3OH)

3.2.23 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)

3.2.24 แมงกานีสคลอไรด์เฮกซะคลอไรด์ ($MnCl_2 \cdot 6H_2O$)

3.2.25 ยูเรีย (N_2H_6CO)

3.2.26 สารมาตราฐานพอลีเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

3.2.27 สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)

3.2.28 สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)

3.2.29 เอนไซม์อินเวอร์เทส

3.2.30 เอนไซม์ยูรีเอส

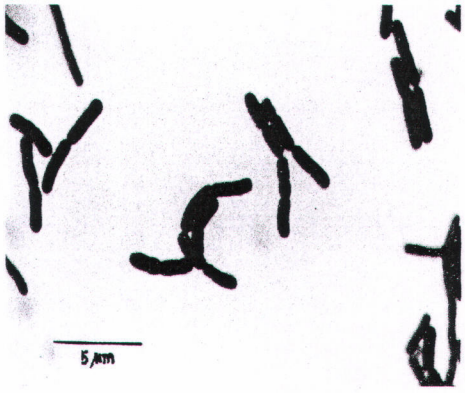
3.2.31 แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต [$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$]

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

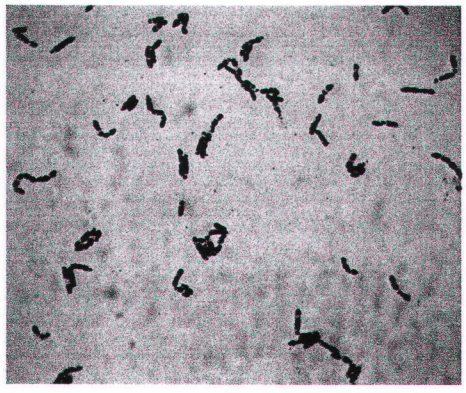
3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

จุลินทรีย์ที่ใช้คือ *Bacillus megaterium* BA-019 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในห้องปฏิบัติการโดยรัตนศิริ มุทิตากุล (2538) และจัดจำแนกสปีชีส์โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA โดยกุสุมา กมลจรัสโสภา (2547)



รูปที่ 3.1 *Bacillus megaterium* BA-019 เมื่อย้อมสีแกรม กำลังขยาย 1,000 เท่า



รูปที่ 3.2 *Bacillus megaterium* BA-019 เมื่อย้อมสีซูดาน แบลค บี กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.2.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (stock culture medium) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

beef extract	3	กรัม
bacto tryptose	5	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (การนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน)

3.3.2.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed culture medium) ใช้สูตรของ Doi และคณะ (1986) ซึ่งศึกษาปรับปรุงโดย สุดา สุภาชวินสวัสดิ์ (2542) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

yeast extract	10	กรัม
bacto tryptose	10	กรัม
beef extract	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
น้ำตาลทราย	10	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกสารละลายน้ำตาลนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.3.2.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการสร้างและสะสม P(3HB) คือ อาหาร MSM (Mineral salt medium) ใน 1 ลิตรประกอบด้วย

น้ำอ้อยที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar)	20	กรัม
ยูเรีย	0.8	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัม
กรดซิตริก	0.75	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.1	กรัม
สารละลาย trace element	1.0	มิลลิลิตร

แยกละลายเกลือแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตและสารละลาย trace element เมื่อละลายแล้วจึงนำมารวมกัน ปรับ pH เป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ส่วนของสารละลายน้ำตาลแยกนึ่งฆ่าเชื้อที่ ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

สารละลาย trace element ใน 1 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริก 1 ลิตร ประกอบด้วย

แคลเซียมคลอไรด์	20.0	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	1.30	กรัม
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.20	กรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต	0.60	กรัม
กรดบอริก	0.60	กรัม

แมงกานีสคลอไรด์เฮกซะคลอไรด์	0.08	กรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	0.50	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต	0.05	กรัม
นิกเกิลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	0.02	กรัม

3.3.3 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

3.3.3.1 การเก็บรักษาแบคทีเรีย

เขี่ยแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเททับด้วย 15% กลีเซอรอลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.4 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดทดลองภายใต้ภาวะการเจริญที่สมดุล (balanced growth condition)

3.3.4.1 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเป็นกล้าเชื้อ

นำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ตามข้อ 3.3.3.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอียงใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85 %) เพื่อทำให้เป็นเซลล์แขวนลอย (cell suspension) และปรับความเข้มข้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.4

3.3.4.2 การศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต

ถ่ายหัวเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.4.1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (OD_{600}= 0.4) ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร (4% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และคำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ)

3.3.4.3 การผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดทดลองภายใต้ภาวะการเจริญที่สมดุล

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* BA-019 ตามข้อ 3.3.4.2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลอง 250 มิลลิลิตร เปรียบเทียบการผลิต P(3HB) เมื่อใช้น้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้

3.3.5 ศึกษาผลของการจำกัดธาตุอาหารแต่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินพอที่มีต่อการเจริญ การสังเคราะห์และสะสม P(3HB)

3.3.5.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำอ้อยที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต P(3HB)

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* BA-019 ตามข้อ 3.3.4.2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลอง 250 มิลลิลิตร เปรียบเทียบการผลิต P(3HB) เมื่อใช้น้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมแตกต่างกันโดยใช้ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้

3.3.5.2 การศึกษาผลของการจำกัดธาตุอาหารจำเป็นบางชนิดต่อการผลิต P(3HB)

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* BA-019 ตามข้อ 3.3.4.2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยมีการจำกัดธาตุอาหารบางชนิด ได้แก่

ก. จำกัดปริมาณไนโตรเจน โดยใช้ยูเรียความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 และ 1.2 กรัมต่อลิตร โดยใช้ปริมาณคาร์บอนที่ได้จากข้อ 3.3.5.1 ส่วนสารอื่นใช้ในปริมาณเท่าเดิม (สูตรอาหาร MSM)

ข. จำกัดปริมาณแมกนีเซียม โดยใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้น 0 0.1 และ 0.2 กรัมต่อลิตร โดยใช้ปริมาณไนโตรเจนที่ได้จากข้อ 3.3.5.2 (ก) ส่วนสารอื่นใช้ในปริมาณเท่าเดิม

ค. ผลร่วมระหว่างโพแทสเซียมและฟอสเฟต โดยใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 2.0 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โดยใช้ปริมาณไนโตรเจนที่ได้จากข้อ 3.3.5.2 (ก) และใช้ปริมาณแมกนีเซียมที่ได้จากข้อ 3.3.5.2 (ข) ส่วนสารอื่นใช้ในปริมาณเท่าเดิม

เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้

3.3.6 การผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) ที่ศึกษาได้จากข้อ 3.3.5.2 มาเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร

3.3.6.1 การผลิต P(3HB) จากน้ำอ้อย

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* BA-019 ตามข้อ 3.3.4.2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงกล้าเชื้อให้ได้ปริมาตร 300 มิลลิลิตร (คิดเป็น 10% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 3 ลิตร โดยเลือกภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) จากข้อ 3.3.5.2 ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ตลอดการเลี้ยงเชื้อ โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ตามลำดับ(อติพล บุญเรืองถาวร, 2543) เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้ และคำนวณหาค่าอัตราการผลิต (productivity)

3.3.6.2 การผลิต P(3HB) จากกากน้ำตาล

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ภาวะเช่นเดียวกับข้อ 3.3.6.1 แต่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำอ้อย เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้ และคำนวณหาค่าอัตราการผลิต (productivity) เปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้ในข้อ 3.3.6.1

3.4 วิธีวิเคราะห์

3.4.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์ โดยการเซนตริฟิวส์ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปใส่ในถ้วยอลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว อบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักถ้วยที่มีเซลล์อบแห้ง คำนวณหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข) ในหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์แล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายอินเวอร์เทส 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธีของ Bernfeld (1955) โดยเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid, DNSA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแช่ในอ่างน้ำเย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำตาลซูโครส และค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณยูเรีย

ตามวิธีของ Kemper (1974) นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุตามความเหมาะสมปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ยูเรียเอส (urease) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 5 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย EDTA 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอลไนโตรพัสไซด์ 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรด์ 4 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดประจุ 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร (ในน้ำกลั่นปลอดประจุเป็นตัวเปรียบเทียบ) คำนวณหาปริมาณยูเรีย (หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร) โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณยูเรีย และค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร

3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟี (Gas Chromatography : GC)

ตามวิธีของ Comeau และ คณะ (1988) โดยการปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ชั่งเซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัม ใส่หลอดฝาเกลียวเติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 3 (3 % acidified methanol) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารละลายมาตรฐานภายในความเข้มข้นเท่ากับปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3.5 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง 5 นาที และนำไปปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที เก็บชั้นคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) ซึ่งมีอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ของโมโนเมอร์ไปสกัดแยกกรดและกากเซลล์ตามวิธีข้างต้นอีกครั้ง ถ่ายชั้นคลอโรฟอร์มใส่หลอดฝาเกลียวสำหรับวิเคราะห์ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟฟี แล้ววิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) โดยวิธี GC ภายใต้ภาวะ ดังนี้

ชนิดของคอลัมน์	: แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด CP wax – 52 CB เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 60 เมตร
อุณหภูมิของ injector	: 250 องศาเซลเซียส (isothermal)
อุณหภูมิของคอลัมน์	: 130 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียส ต่อนาที รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 180 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ Detector (FID)	: 250 องศาเซลเซียส (isothermal)
Split ratio	: 50 ต่อ 1
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	: ก๊าซไนโตรเจนอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	: 1 ไมโครลิตร

3.4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำอ้อยด้วยเครื่อง ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)

นำน้ำอ้อยมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำส่วนที่กรองได้ไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์หาน้ำตาลกลูโคส ฟรักโตสและซูโครส โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีก (peak area) ของน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด โดยวิเคราะห์ภายใต้ภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์	: Phenomenax Spherisorb NH_2LCD
ชนิดของดีเทคเตอร์	: Refractive Index Detector
flow rate	: 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	: 90% อะซีโตไนไตรล์ในน้ำ (ปริมาตรต่อปริมาตร)
ปริมาตรที่ฉีด	: 5 ไมโครลิตร