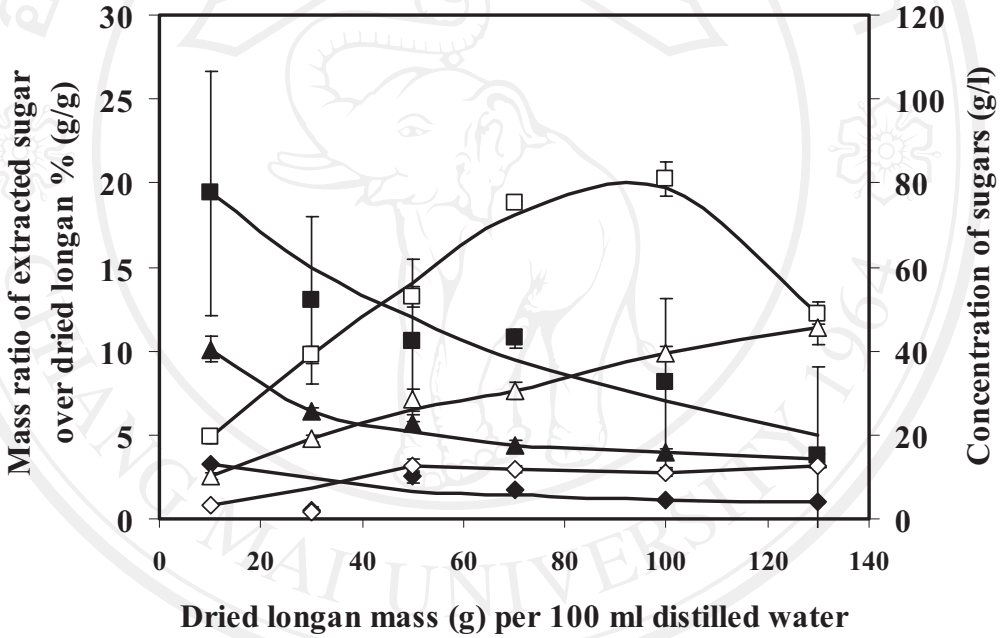
ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

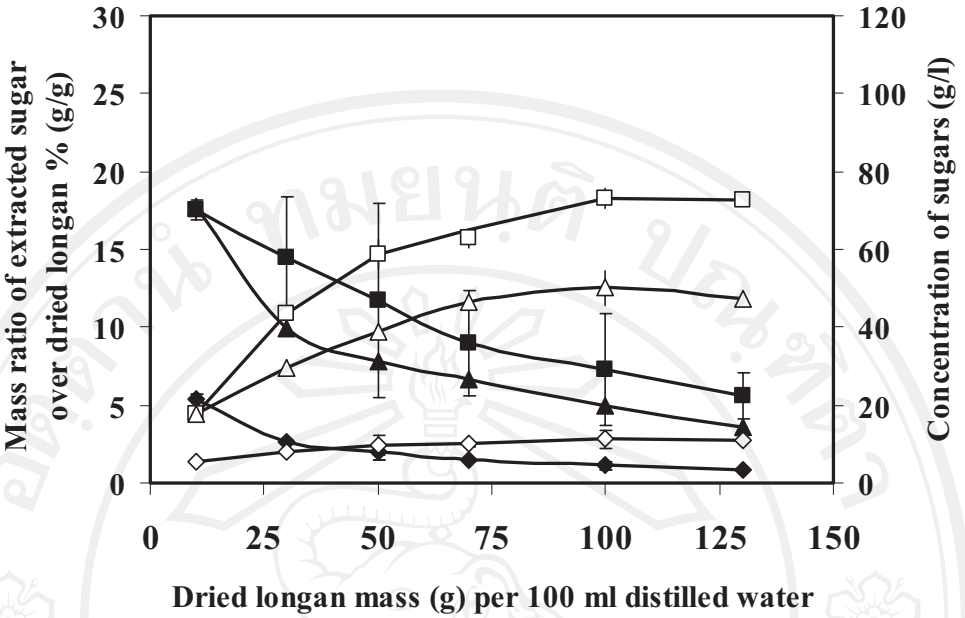
ภาคผนวก ก

ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส และ
สัดส่วนมวลน้ำตาลแต่ละชนิดต่อกรัมลำไยอบแห้ง
จากการสกัดวิธี ST30, S24, S24B30, และ B30x2

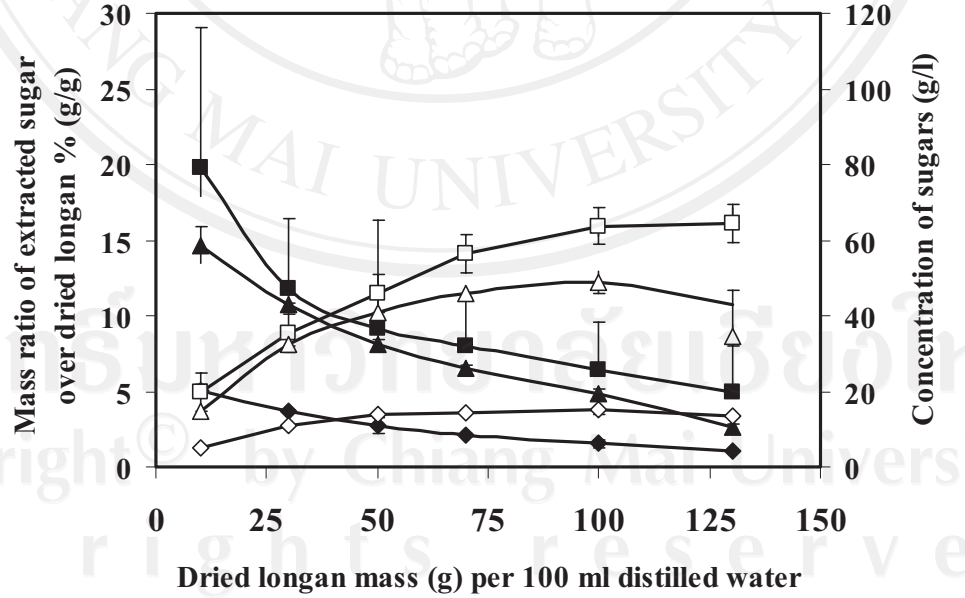


ภาพ ก.1 ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร) ของน้ำตาลซูโครส (□) ฟรุกโตส (△) และกลูโคส (◇) ที่สกัดได้ รวมถึงสัดส่วนมวล (กรัม) น้ำตาลแต่ละชนิด (■, ▲, ◆) ต่อกรัมลำไยอบแห้ง ในกรณีสกัด ST30 สำหรับมวลลำไยหลายระดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

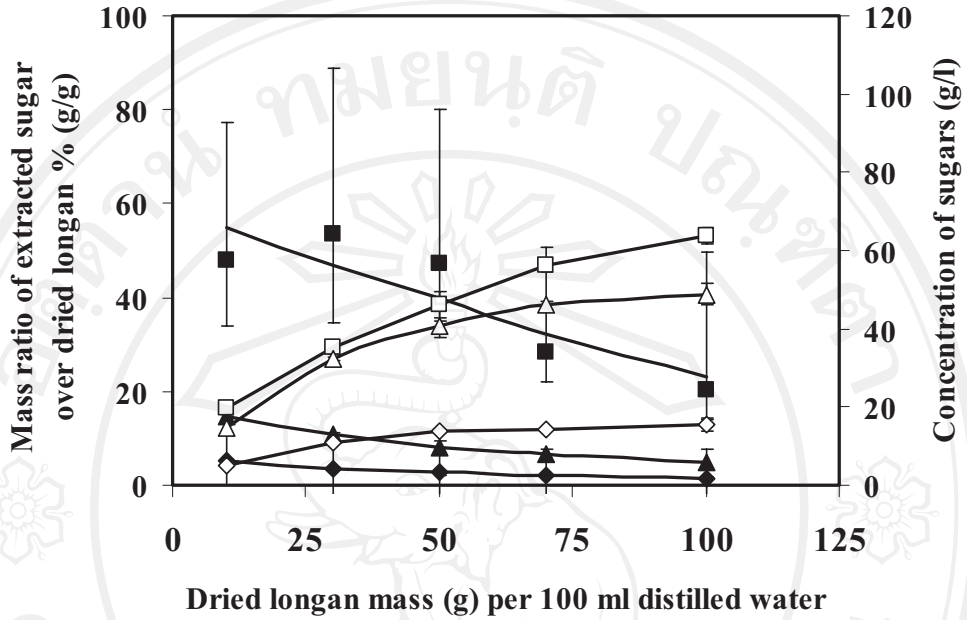


ภาพ ก.2 ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร) ของน้ำตาลซูโครส (□) ฟรุกโตส (△) และกลูโคส (◇) ที่สกัดได้ รวมถึงสัดส่วนมวล (กรัม) น้ำตาลแต่ละชนิด (■, ▲, ◆) ต่อกรัมลำไยอบแห้ง ในกรณีสกัด S24 สำหรับมวลลำไยหลายระดับ



ภาพ ก.3 ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร) ของน้ำตาลซูโครส (□) ฟรุกโตส (△) และกลูโคส (◇) ที่สกัดได้ รวมถึงสัดส่วนมวล (กรัม) น้ำตาลแต่ละชนิด (■, ▲, ◆) ต่อกรัมลำไยอบแห้ง ในกรณีสกัด S24B30 สำหรับมวลลำไยหลายระดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ ก.4 ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร) ของน้ำตาลซูโครส (□) ฟรุกโตส (△) และกลูโคส (◇) ที่สกัดได้ รวมถึงสัดส่วนมวล (กรัม) น้ำตาลแต่ละชนิด (■, ▲, ◆) ต่อกรัมลำไยอบแห้ง ในกรณีสกัด B30x2 สำหรับมวลลำไยหลายระดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารสกัดลำไยเข้มข้น

1. การเตรียมสารสกัดลำไยอบแห้งเข้มข้น

ต้มเนื้อลำไยอบแห้งและน้ำกลั่นโดยใช้เนื้อลำไยอบแห้ง 30 กรัม ต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต้มน้ำกลั่นจนเดือดแล้วเติมเนื้อลำไยอบแห้งลงไป ปิดฝารอจนน้ำเดือดอีกครั้ง แล้วต้มต่ออีก 30 นาที จากนั้นนำไปกรองด้วยผ้าขาวบางซ้อนกัน 3 ชั้น ปรับระดับความเป็นกรดด่างให้ได้ 6.5 ด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10 โมลาร์ วัดค่าของแข็งที่ละลายน้ำได้ (total soluble solid, TSS) จะได้ระดับประมาณ 17 องศา-บริกซ์ นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมสารสกัดจากลำไยสดเข้มข้น

ต้มเนื้อลำไยสดและน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 (มวลต่อปริมาตร) ต้มน้ำกลั่นจนเดือด แล้วเติมเนื้อลำไยสดลงไป ปิดฝารอจนน้ำเดือดอีกครั้งแล้วต้มต่ออีก 30 นาที ปรับ TSS ให้ได้ 17 องศาบริกซ์ หากยังไม่ได้ค่าดังกล่าวให้ต้มระเหยน้ำต่อจนได้ค่า TSS ตามระดับที่ต้องการ นำไปกรองด้วยผ้าขาวบางซ้อนกัน 3 ชั้น ปรับระดับความเป็นกรดด่างให้ได้ 6.5 ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10 โมลาร์ นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

วิธีการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยถังความดันฆ่าเชื้อ

1. ทำความสะอาดเครื่องแก้วหรือวัสดุอุปกรณ์ที่ทนทานต่อสภาวะฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ณ 121 องศา-เซลเซียส ความดัน 1 บรรยากาศ เป็นเวลา 15 นาที ด้วยน้ำกลั่น หรือเตรียมสารละลายองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อในขวดแก้วทนความร้อน โดยกำหนดปริมาตรของเหลวในแต่ละภาชนะไม่ให้เกินร้อยละ 60 ของปริมาตรภาชนะ เพื่อป้องกันของเหลวเดือดล้นภาชนะ
2. ติดแถบกาวตรวจสอบการฆ่าเชื้อด้านข้างอุปกรณ์ เครื่องแก้วหรือภาชนะที่บรรจุสารละลายองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ หากการฆ่าเชื้อเป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนดจะเกิดแถบสีดำขึ้น
3. เติมน้ำลงในถังฆ่าเชื้อให้มีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร จากก้นถัง เมื่อบรรจุตะกร้าอะลูมิเนียมใส่วัสดุ น้ำหนักที่กดลงจะทำให้เกิดคอลัมน์ของน้ำแทรกอยู่ระหว่างผนังด้านในของถังและผนังด้านนอกของตะกร้าได้ความสูงเกือบท่วมขอบถัง
4. บรรจุวัสดุอุปกรณ์ที่ต้องการฆ่าเชื้อลงในตะกร้า สำหรับขวดที่มีของเหลวหรือสารละลายบรรจุให้ทำการคลายฝาขวดเล็กน้อย เพื่อช่วยปรับความดันไอน้ำระหว่างภายในและภายนอกขวด แล้วปิดถังโดยให้สัญลักษณ์ลูกศรที่ถัง และตัวล็อคระหว่างฝากับตัวถังเข้าที่ ปิดช่องปล่อยไอน้ำที่ฝา โดยปรับให้หัวปล่อยไอน้ำพับลงด้วยคีมเหล็ก
5. นำถังฆ่าเชื้อไปตั้งที่เตาแก๊ส เปิดแก๊ส สังเกตมาตรวัดระดับความดัน รอกระทั่งความดันขึ้นถึง 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จึงปล่อยอากาศออกโดยปรับให้หัวปล่อยไอน้ำให้ตั้งขึ้นด้วยคีมเหล็ก หากไม่ปล่อยอากาศก่อนการฆ่าเชื้อ ระดับความดันของก๊าซผสม 1 บรรยากาศ จะมีอุณหภูมิไม่ถึง 121 องศาเซลเซียส เนื่องจากก๊าซในถังไม่ใช่ไอน้ำบริสุทธิ์ทั้งหมด
6. รอจนกระทั่งระดับความดันลดต่ำลงจนไม่เปลี่ยนแปลงแล้ว จึงปิดช่องปล่อยอากาศ แล้วสังเกตมาตรวัดความดัน กระทั่งความดันเข้าอยู่ในโซนสีเขียว จึงเริ่มจับเวลาฆ่าเชื้อ 15 นาที ระหว่างนั้นให้คอยปรับความแรงของเปลวไฟที่ปล่อยจากหัวแก๊สเพื่อรักษาระดับความดันให้อยู่ในโซนสีเขียวตลอดเวลาการฆ่าเชื้อ
7. เมื่อครบเวลาฆ่าเชื้อ ให้ปิดแก๊สทันที แล้วติดป้ายระวังถังร้อนไว้ที่ตัวถัง
8. รอจนกระทั่งระดับความดันที่มาตรวัดลดลงเหลือ 0 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จึงทำการเปิดฝาถัง แล้วปิดฝาขวดที่อยู่ภายในถังให้แน่นก่อนนำออกจากถังฆ่าเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9. ปล่อยให้วัสดุ อุปกรณ์ หรือภาชนะที่บรรจุสารละลายหรืออาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วนำไปเก็บรักษาในตู้หรือตู้แช่แข็งที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ง
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด ในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1 บรรยากาศ (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) นาน 15 นาที

1. Nutreint broth

ละลายเนื้อสกัด 3 กรัม เปปโตน 5 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร ก่อนนำไปฆ่าเชื้อ

2. Yeast medium

เตรียมแหล่งอาหารคาร์บอนโดยละลายน้ำตาลกลูโคส 10 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร เตรียมแหล่งอาหารไนโตรเจนโดยละลายยีสต์สกัด 3 กรัม มอลต์สกัด 5 กรัม และเปปโตน 5 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อ รอให้แหล่งอาหารคาร์บอนและไนโตรเจนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วจึงนำแหล่งอาหารทั้งสองชนิดผสมกันภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ

3. *Zymomonas* media

เตรียมแหล่งอาหารคาร์บอนโดยละลายน้ำตาลกลูโคส 20 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร เตรียมแหล่งอาหารไนโตรเจนโดยละลายยีสต์สกัด 10 กรัม และเปปโตน 10 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อแล้วจึงนำแหล่งอาหารทั้งสองชนิดผสมกันภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ

แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดลงในขวดเลี้ยงกล้าเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร ขวดละ 10 มิลลิลิตร สำหรับระดับการหมัก 100 มิลลิลิตรในการทดลองตอนที่ 3.4.2 หรือ 15 มิลลิลิตร สำหรับระดับการหมัก 150 มิลลิลิตร ในการการทดลองตอนที่ 3.4.3 โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก จ

การเตรียมแหล่งอาหารไนโตรเจนเข้มข้นสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ
ที่มีสารสกัดลำไยอบแห้งและลำไยสดเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อ

1. แหล่งอาหารไนโตรเจนเข้มข้นสำหรับ *E. coli* และ *Klebseilla* sp.

ละลายเนื้อสกัด 18.75 กรัม และเปปโตน 31.25 กรัม ในสารสกัดลำไยอบแห้งหรือลำไยสดแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร ด้วยสารสกัดลำไยอบแห้งหรือลำไยสดในขวดปรับปริมาตร

2.* แหล่งอาหารไนโตรเจนเข้มข้นสำหรับ *C. utilis* และ *S. cerevisiae

ละลายยีสต์สกัด 75 กรัม มอลต์สกัด 125 กรัม และเปปโตน 125 กรัม ในสารสกัดลำไยอบแห้งหรือลำไยสด แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร ด้วยสารสกัดลำไยอบแห้งหรือลำไยสดในขวดปรับปริมาตร

3.* แหล่งอาหารไนโตรเจนเข้มข้นสำหรับ *Zymomonas mobilis

ละลายยีสต์สกัด 62.5 กรัม และเปปโตน 62.5 กรัม ในสารสกัดลำไยอบแห้งหรือลำไยสดแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร ด้วยสารสกัดลำไยอบแห้งหรือลำไยสดในขวดปรับปริมาตร

นำแหล่งอาหารไนโตรเจนเข้มข้นทั้ง 3 ชนิดไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1 บรรยากาศ (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) นาน 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ฉ
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสารสกัดลำไยอบแห้งและลำไยสด ระดับ 100, 150 และ 1,500 มิลลิลิตร สำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงในระดับ 100 มิลลิลิตร สำหรับการทดลองตอนที่ 3.4.2

1.1 กรณีไม่เติมแหล่งอาหารไนโตรเจนเข้มข้น

ตวงสารสกัดลำไยเข้มข้นที่ผ่านการปรับระดับความเป็นกรดด่างให้มีค่าเท่ากับ 6.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเล็ก หยดไดโพรพิลีนไกลคอล 4 หยด เพื่อยับยั้งการเกิดฟอง นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1 บรรยากาศ นาน 15 นาที จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยจะนำมาละลายและปรับอุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 25.6 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้งาน

1.2 กรณีเติมแหล่งอาหารไนโตรเจนเข้มข้น

ตวงสารสกัดลำไยเข้มข้นที่ผ่านการปรับระดับความเป็นกรดด่างให้มีค่าเท่ากับ 6.5 ปริมาตร 94 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเล็ก หยดไดโพรพิลีนไกลคอล 4 หยด เพื่อยับยั้งการเกิดฟอง นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1 บรรยากาศ นาน 15 นาที ใช้ปิเปตปลอดเชื้อถ่ายเทแหล่งอาหารไนโตรเจนเข้มข้นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 6 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดสารสกัดลำไยด้วยเทคนิคปลอดเชื้อดังภาพ ฉ.1 จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยจะนำมาละลายและปรับอุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 25.6 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้งาน

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงระดับ 1,500 มิลลิลิตร ในการทดลองตอนที่ 3.4.3

2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงหัวเชื้อในระดับ 150 มิลลิลิตร

ตวงสารสกัดลำไยเข้มข้นที่ผ่านการปรับระดับความเป็นกรดด่างให้มีค่าเท่ากับ 6.5 ปริมาตร 141 มิลลิลิตร ใส่ในขวดเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเล็ก หยดไดโพรพิลีนไกลคอล 4 หยด เพื่อยับยั้งการเกิดฟอง แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศา-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เซลเซียส ความดัน 1 บรรยากาศ นาน 15 นาที ใช้ปิเปตปลอดเชื้อถ่ายเทแหล่งอาหารไนโตรเจนเข้มข้นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 9 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดสารสกัดลำไยด้วยเทคนิคปลอดเชื้อดังภาพ ฉ.1 จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยจะนำมาละลายและปรับอุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 25.6 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้งาน

2.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อระดับ 1,500 มิลลิลิตร

ตวงสารสกัดลำไยเข้มข้นที่ปรับระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5 ปริมาตร 1,410 มิลลิลิตร ใส่ในขวดเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดใหญ่ หยดไดโพรพิลีนไกลคอล 5 หยด แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1 บรรยากาศ นาน 15 นาที ใช้กระบอกตวงปลอดเชื้อขนาด 100 มิลลิลิตร ตวงแหล่งอาหารไนโตรเจนเข้มข้นปริมาตร 90 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดสารสกัดลำไยด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยจะนำมาละลายและปรับอุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 25.6 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้งาน

ภาพ ฉ.1 การเติมแหล่งอาหารไนโตรเจนด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ช

การวัดความเข้มข้นมวลชีวภาพแห้ง

1. ล้างทำความสะอาดหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตรที่จะนำมาใช้ในการวัดมวลชีวภาพแห้ง อบให้แห้งด้วยเตาอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส (Memmert, Model No. 400, Oxford, United Kingdom)
2. ปล่อยให้อุณหภูมิของหลอดหมุนเหวี่ยง มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น จากนั้นชั่งน้ำหนัก (ไม่รวมฝา) กำหนดให้เป็นน้ำหนักหลอดเปล่า (m_i)
3. เมื่อเก็บตัวอย่างมาแล้ว นำหลอดหมุนเหวี่ยงไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 5,000 รอบต่อนาที (2,822×g) นาน 15 นาที ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Nuve, Model No. NF200, Angara, Turkey) แล้วแยกเก็บของเหลวที่ได้ไว้ในหลอดหมุนเหวี่ยงอีกหลอด
4. ทำการล้างตะกอนเซลล์ที่แยกได้ โดยเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer, LMS, Model VTX-3000L, Tokyo, Japan) จนตะกอนที่ก้นหลอดเป็นสารแขวนลอยในน้ำกลั่น แล้วนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง แยกของเหลวทิ้งไป จะได้ตะกอนเซลล์ที่สะอาด
5. นำตะกอนเซลล์ที่สะอาดแล้วไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง (ไม่รวมฝา)
6. เก็บตัวอย่างเซลล์ที่แห้งแล้วและปล่อยให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก กำหนดให้เป็นน้ำหนักหลอด (ไม่รวมฝา) และตะกอนเซลล์แห้ง (m_f)
7. คำนวณความเข้มข้นของมวลชีวภาพแห้ง (C) ในหน่วยกรัมต่อลิตรจาก

$$C = ((m_f - m_i)/10) \times 1000$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ซ

การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

1. นำตัวอย่างมาปั่นหมุนเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 5,000 รอบต่อนาที (2,822×g) นาน 15 นาที ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง แล้วแยกเก็บของเหลวที่ได้ไว้ในหลอดหมุนเหวี่ยงอีกหลอด
2. ทำการล้างตะกอนเซลล์ที่แยกได้ โดยเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องผสมสารละลาย จนตะกอนที่ก้นหลอดเป็นสารแขวนลอยในน้ำกลั่น แล้วนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง แยกของเหลวทิ้งไป จะได้ตะกอนเซลล์ที่สะอาด
3. เติมน้ำกลั่นลงไปในหลอดหมุนเหวี่ยงจนได้ปริมาตรตัวอย่างเท่าเดิม เขย่าด้วยเครื่องผสมสารละลายจนตะกอนที่ก้นหลอดเป็นสารแขวนลอยในน้ำกลั่น
4. ดูดตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลตร ใส่ลงในคิวเว็ตขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงแบบ double - beam (PerkinElmer Instruments, Model No. Lambda 25 UV/VIS Spectrometer, Shelton, United States of America)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ฌ

การทำให้ผนังเซลล์ยีสต์เกิดรูรั่ว

1. ปรับปริมาตรเซลล์ที่บรรจุในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร ให้ได้ 1 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ที่มีระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.00
2. นำหลอดหมุนเหวี่ยงในข้อ 1 จุ่มลงในไนโตรเจนเหลวจนของผสมในหลอดหมุนเหวี่ยงเปลี่ยนสภาพเป็นของแข็งอย่างทั่วถึง จากนั้นจุ่มหลอดในน้ำอุ่นที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส กระทั่งน้ำแข็งในหลอดหมุนเหวี่ยงละลายหมด ทำซ้ำข้อ 1 และ 2 จำนวน 3 รอบ เพื่อให้ผนังเซลล์อ่อนตัว
3. เติมลูกปัดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.55 มิลลิเมตร (Sigma, Cat. No. G8772) ปริมาตรเท่ากันกับปริมาตรเซลล์ยีสต์ ลงในหลอดหมุนเหวี่ยง
4. ทำการบดเซลล์ด้วยลูกปัดแก้วโดยใช้เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) นาน 1 นาที แล้วจุ่มลงในน้ำผสมน้ำแข็งอีก 1 นาที ทำซ้ำ 3 รอบ เพื่อทำให้ผนังเซลล์เกิดรูรั่ว
5. ใช้ Pasteur pipette ดูดของเหลวที่เหลือใส่ในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร
6. นำหลอดไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเอาของเหลวใสที่ 13,400 rpm หรือ 12,100×g เป็นเวลา 2 นาที นำไปเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

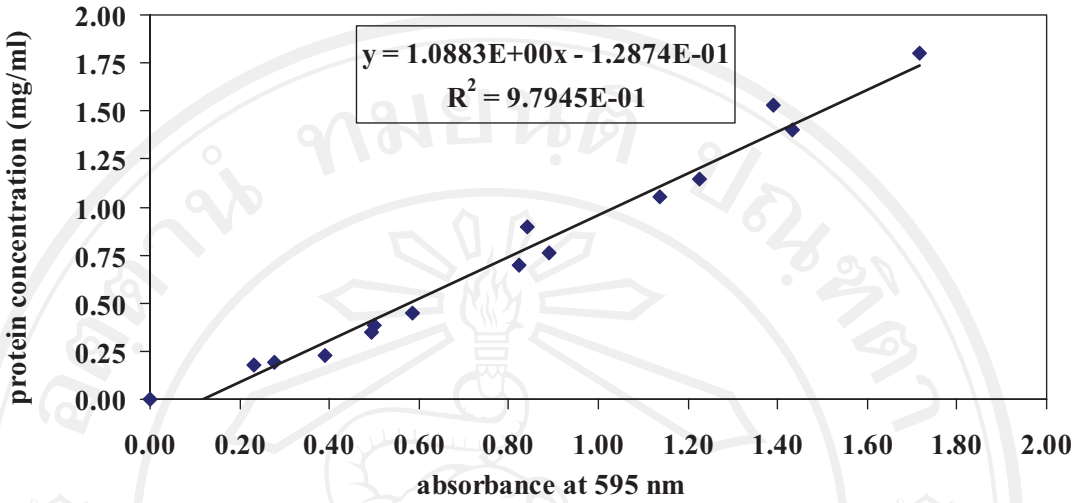
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ญ
การวิเคราะห์โปรตีนที่ละลายได้ด้วยวิธี Bradford

การวิเคราะห์ความเข้มข้นโปรตีนด้วยวิธีนี้สามารถทำได้ง่ายและมีค่าความถูกต้องสูง เหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีโปรตีนอยู่ในรูปของสารละลาย โดยระดับความเข้มข้นของสีหลังทำปฏิกิริยาจะเปลี่ยนแปลงไปตามระดับความเข้มข้นของโปรตีน ทั้งนี้ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของ Coomassie® Brilliant Blue G-250 จะเปลี่ยนจากที่ 465 นาโนเมตร เป็น 595 นาโนเมตร เมื่อเกิดการจับตัวกับโปรตีนในสารละลายแล้ว โปรตีนที่มีฟังก์ชั่นหมู่ อะมิโนเป็นเบสและแอโรมาติกโดยเฉพาะอย่างยิ่ง อาร์จีนีน (arginine) จะทำปฏิกิริยาได้ดี แต่ไม่เหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีองค์ประกอบเป็นบัฟเฟอร์คุณสมบัติเบสหรือสารลดแรงตึงผิว และตัวอย่างที่มีโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลต่ำกว่า 3,000 – 5,000 ดาลตัน เช่น casein hydrolysate หรือ yeast hydrolysate เพราะจะรบกวนการเปลี่ยนสีของ Coomassie Blue (Biorad, 2007) ทั้งนี้ Stockchecker (1990) ยังแนะนำให้เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ระหว่างการวิเคราะห์เพื่อให้โปรตีนที่อยู่ในเยื่อเลือกผ่านละลายออกมาได้ และลดระดับสีที่แตกต่างกันระหว่างโปรตีนแต่ละชนิด โดยวิธีการวิเคราะห์มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เจือจางตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 ไมโครลิตร
2. เติมตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในคิวเว็ต (cuvette) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุสารละลาย Coomassie Brilliant Blue® G-250 เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 4 โดยใช้ Coomassie Brilliant Blue® G-250 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร
3. ให้สารทำปฏิกิริยาจนได้สีที่คงที่เป็นเวลา 5 นาที
4. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร แล้วคำนวณความเข้มข้นโปรตีนด้วยสมการจากเส้นโค้งมาตรฐาน ตัวอย่างเส้นโค้งมาตรฐานแสดงในภาพ ญ.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ ญ.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน albumin bovine fraction V ความเข้มข้น 0.17 - 1.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ฎ

การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส (pyruvate decarboxylase, PDC) โดยใช้ Carboligase assay

นอกเหนือจากการขจัดหมู่คาร์บอนไดออกไซด์ออกจากไพรูเวตแล้ว PDC ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อพันธะคาร์บอนระหว่างไพรูเวตและเบนซาลดีไฮด์ได้ด้วย ตามที่ได้แสดงไปแล้วในภาพ 2.4 โดยส่วนประกอบและความเข้มข้นของสารเคมีในสารละลายคาร์โบไลเกสบัฟเฟอร์(ที่ระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.4 และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) ดังแสดงในตาราง ฎ.1

ตาราง ฎ.1 ส่วนประกอบและความเข้มข้นของสารเคมีในสารละลายคาร์โบไลเกสบัฟเฟอร์

สารเคมี	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)
กรดซิตริก	200
TPP	2
$MgSO_4 . 7H_2O$	20
โซเดียมไพรูเวต	200
เบนซาลดีไฮด์	80
เอทานอล	3,000

วิธีการเตรียมสารละลายคาร์โบไลเกสบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร ระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.4

1. ละลายสารเคมีดังตาราง ฎ.2 ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรประมาณ 35 มิลลิลิตร (เผื่อปริมาตรไว้สำหรับการปรับระดับความเป็นกรดด่าง)

ตาราง ฎ.2 ปริมาณสารเคมีต่างๆในสารละลายคาร์โบไลเกสบัฟเฟอร์

สารเคมี	ปริมาณ (กรัม)	
กรดซิตริก (ปราศจากน้ำ)	1.921	
TPP	0.046	
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.246	
โซเดียมไพรูเวต	1.100	
เอทานอล	6.904 กรัม	896 ไมโครลิตร
เบนซาลดีไฮด์	0.425 กรัม	415 ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ปรับระดับความเป็นกรดด่างให้ได้ 6.4 ด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลาร์
3. ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 50 มิลลิลิตร แบ่งปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่หลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนการวิเคราะห์

1. เติมตัวอย่างเซลล์รวมปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุคาร์โบไลเกสบัฟเฟอร์อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50 ไมโครลิตร
2. ผสมให้เข้ากันดี ปล่อยให้สารทำปฏิกิริยากัน 20 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส
3. เติมกรดไตรคลอโรแอซีติก (trichloroacetic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 100 (มวลต่อปริมาตร) หรือกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 4.5 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา
4. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,300 รอบต่อนาที (19,000×g) นาน 2 นาที
5. เก็บส่วนของเหลวไปวิเคราะห์ความเข้มข้น PAC โดยเครื่อง HPLC สภาวะที่ใช้สำหรับคอลัมน์ HPLC เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้น PAC แสดงไว้ในตาราง ฎ.3

ตาราง ฎ.3 แสดงสภาวะที่ใช้สำหรับคอลัมน์ HPLC เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้น PAC

คอลัมน์	Alltima ™ C8 ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร (Alltech)
ความยาวคอลัมน์	15 เซนติเมตร
เส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์	4.6 มิลลิเมตร
สารละลายตัวพา	แอซีโตไนไตรล์ความเข้มข้นร้อยละ 32 และกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในน้ำกลั่น
อุณหภูมิ	อุณหภูมิห้อง
ความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์	283 นาโนเมตร
ปริมาตรตัวอย่าง	5 ไมโครลิตร
อัตราการไหล	1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
เวลาที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์	20 นาทีต่อ 1 ตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. ทำการคำนวณระดับกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ PDC ได้จาก

V_{assay} = ปริมาตรสุดท้ายของสารละลาย (110 ไมโครลิตร)

V_{sam} = ปริมาตรของตัวอย่าง (50 ไมโครลิตร)

P_{assay} = ความเข้มข้น PAC ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาหลัง 20 นาที (มิลลิโมลาร์ หรือ ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร)

t = เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

$E_{carboligase}$ = ค่ากิจกรรมการทำงานคาร์โบไลเกสของเอนไซม์ PDC

$= (V_{assay}/V_{sam}) \times P_{assay} \times (1/t)$ นาที$^{-1}$

$= (110/50) \times P_{assay}\ U_{carboligase} \times (1/20)$ นาที$^{-1}$

$= 0.11 \times P_{assay}\ U_{carboligase}$ มิลลิลิตร$^{-1}$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ฏ

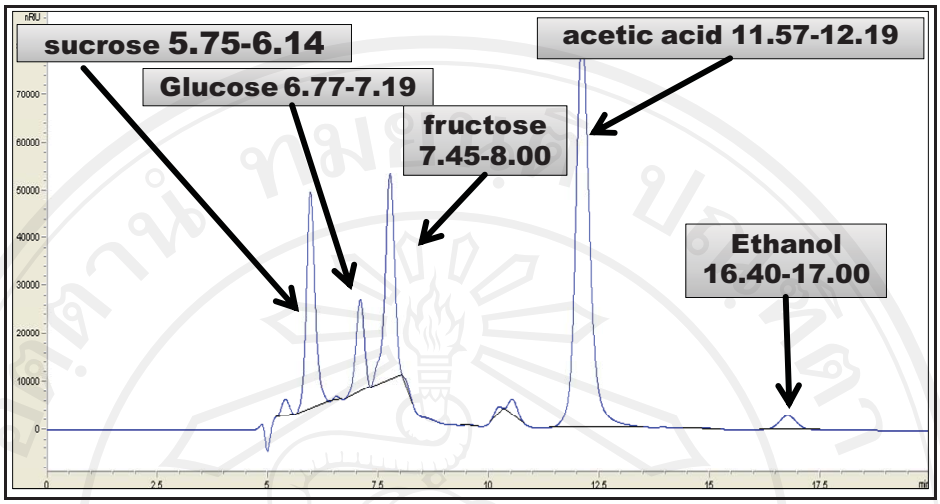
การวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลและสารประกอบอินทรีย์

โดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง

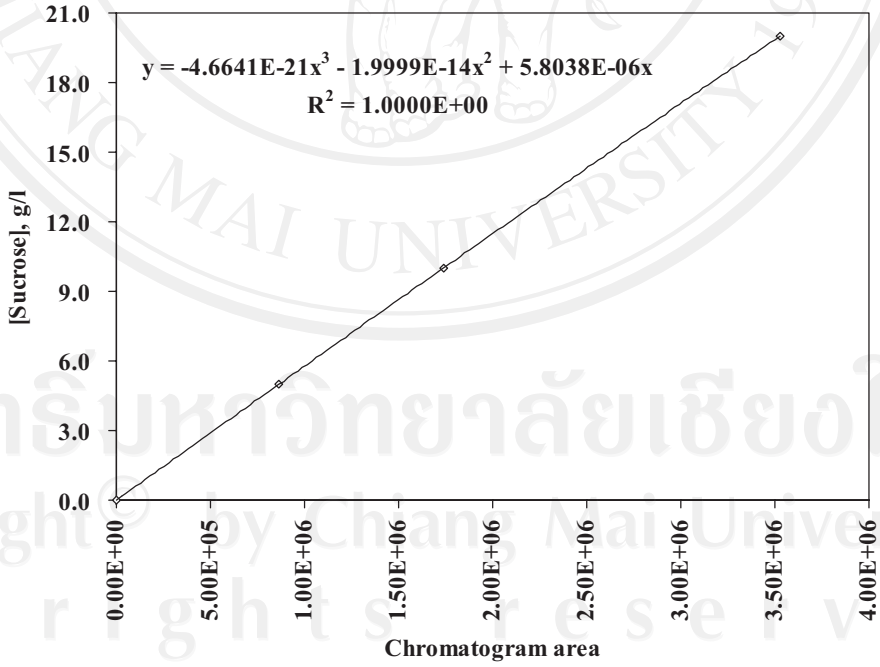
1. เตรียมสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ โดยผสมกรดซัลฟิวริก (ร้อยละ 98) เข้มข้น 18 โมลาร์ ปริมาตร 278 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายไปกำจัดแก๊สและกรองผ่านเมมเบรนไนลอนขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เนื่องจากแก๊สและฝุ่นละอองอาจเจือปนเข้าไปอุดตันทำความเสียหายให้เครื่องและทำให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อนได้
2. ใช้กรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร เป็นสารละลายมาตรฐานสำหรับเจือจางตัวอย่าง 10 เท่า แล้วกรองตัวอย่างผ่านเมมเบรนไนลอนขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร
3. วิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส กรดแอซีติก และเอทานอล ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) จากบริษัท Agilent Technologies ด้วย refractive index detector (RID) ใช้คอลัมน์ Aminex® HPX - 87H Ion Exclusion ขนาดอนุภาค 9 ไมโครเมตร ปริมาตรตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ใช้เวลา 20 นาทีสำหรับการวิเคราะห์ 1 ตัวอย่าง อัตราการไหลเท่ากับ 0.75 มิลลิลิตรต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิของตู้อบคอลัมน์ไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส

เวลา (นาที) ที่สารแต่ละชนิดจะปรากฏมีดังต่อไปนี้ ซูโครส (5.75 – 6.14) กลูโคส (6.70 - 7.10) ฟรุกโตส (7.45 - 8.00) กรดแอซีติก (11.68 – 12.30) และเอทานอล (16.26-17.19) ดังแสดงไว้ในภาพ ฏ.1 กราฟความเข้มข้นมาตรฐานของสารแต่ละชนิดแสดงไว้ดังภาพ ฏ.2 - 6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

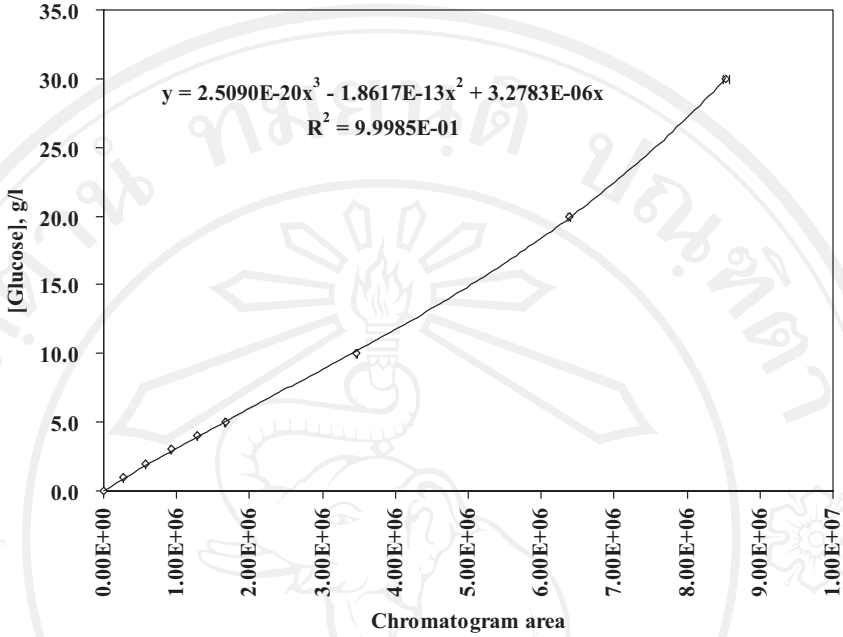


ภาพ ฎ.1 โครมาโตรแกรมของน้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส กรดแอซีติก และเอทานอล

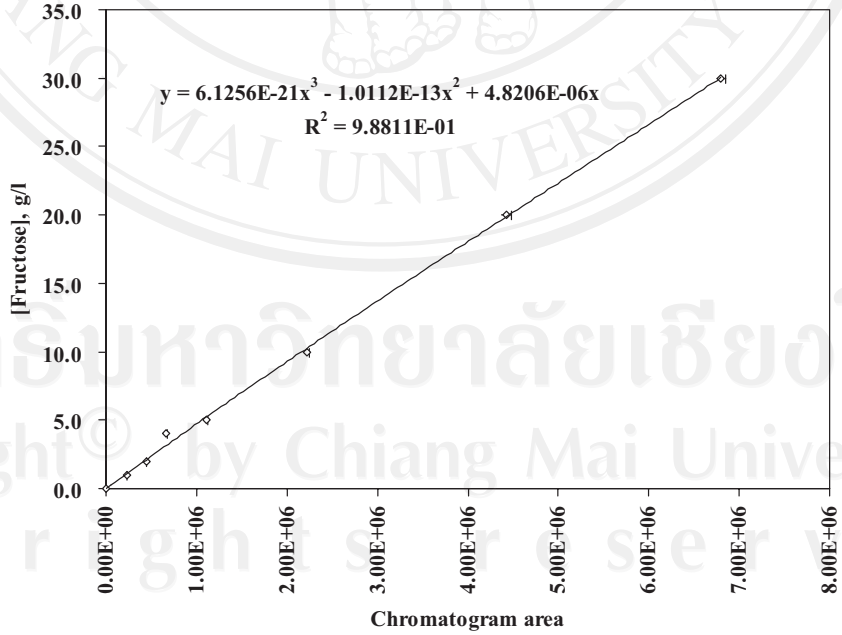


ภาพ ฎ.2 เส้นโค้งความเข้มข้นมาตรฐานน้ำตาลซูโครส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

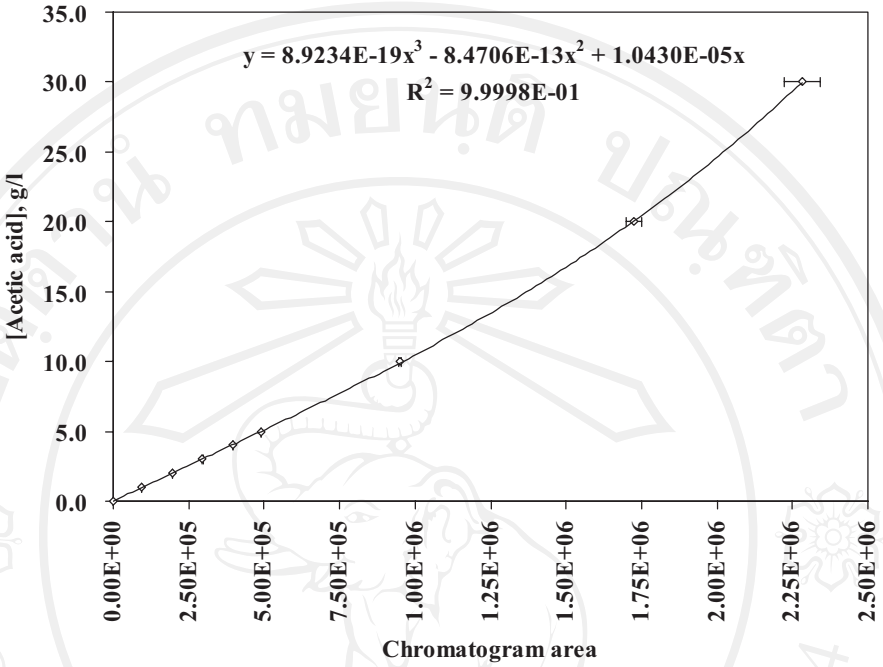


ภาพ ฎ.3 เส้นโค้งความเข้มข้นมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

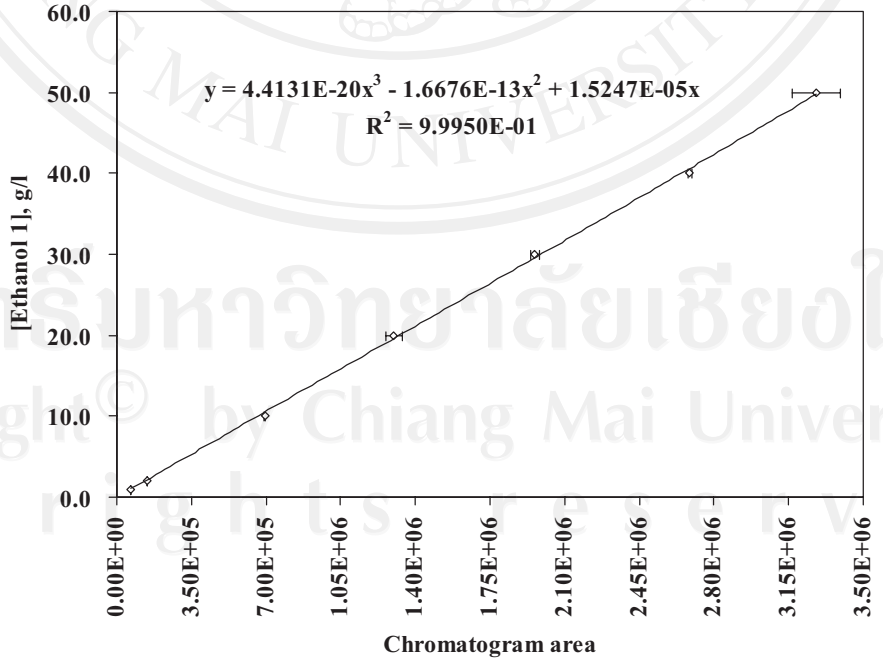


ภาพ ฎ.4 เส้นโค้งความเข้มข้นมาตรฐานน้ำตาลฟรุกโตส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ ฎ.5 เส้นโค้งความเข้มข้นมาตรฐานกรดแอซีติก



ภาพ ฎ.6 เส้นโค้งความเข้มข้นมาตรฐานเอทานอล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

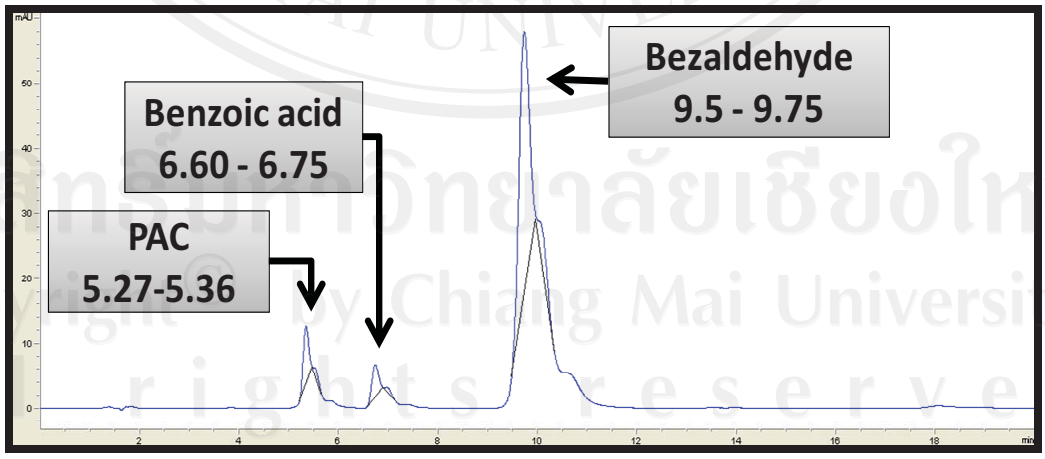
ภาคผนวก ฐ

การวิเคราะห์ความเข้มข้น

ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอล (phenylacetylcarbinol, PAC)

โดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง (HPLC)

1. เตรียมสารละลายที่ประกอบด้วยแอซีโตไนไตรล์เข้มข้นร้อยละ 32 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และกรดแอซีติกเข้มข้นร้อยละ 0.5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยผสมแอซีโตไนไตรล์ 320 มิลลิลิตร และกรดแอซีติก 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น
2. วิเคราะห์ความเข้นข้น PAC กรดเบนโซอิก และเบนซาลดีไฮด์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง จากบริษัท Agilent Technologies ด้วย diode array detector (DAD) ใช้คอลัมน์ Altima™ C8 ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ที่ความยาวคลื่น 283 นาโนเมตร ปริมาตรตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร ใช้เวลา 20 นาที สำหรับการวิเคราะห์ 1 ตัวอย่าง อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิห้อง โดย PAC กรดเบนโซอิก และเบนซาลดีไฮด์ จะปรากฏที่ 5.27 -5.36, 6.60 – 6.75 และ 9.5 – 9.75 นาที ตามลำดับ ดังภาพ ฐ.1



ภาพ ฐ.1 โครมาโตแกรมของ PAC กรดเบนโซอิก และเบนซาลดีไฮด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ฑ

การทดลองไบโอทรานส์ฟอร์เมชั่นในระบบของเหลวสองชั้นแบบแยกชั้น

1. การปรับความเข้มข้นมวลชีวภาพเปียก

ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ 3 กรณี ในระดับ 1,500 มิลลิลิตร ในสภาวะตั้งนิ่งที่มีการเติมอากาศเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่ 25.6 องศาเซลเซียส มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. *S. cerevisiae* TISTR 5606 ด้วยสารสกัดลำไยอบแห้ง (5606D: ซ้ำ 1 และ 5606D2: ซ้ำ 2)
2. *S. cerevisiae* TISTR 5606 ด้วยสารสกัดลำไยสด (5606F1: ซ้ำ 1 และ 5606F2: ซ้ำ 2)
3. *S. cerevisiae* TISTR 5020 ด้วยสารสกัดลำไยสด (5020F1: ซ้ำ 1 และ 5020F2: ซ้ำ 2)

- ความเข้มข้นมวลชีวภาพแห้งสำหรับแต่ละกรณีมีค่าดังต่อไปนี้

1. 5606D1: 6.0 ± 0.08 กรัมต่อลิตร
2. 5606D2: 6.2 ± 0.01 กรัมต่อลิตร
3. 5606F1: 6.0 ± 0.17 กรัมต่อลิตร
4. 5606F2: 6.0 ± 0.02 กรัมต่อลิตร
5. 5020F1: 12.8 ± 0.58 กรัมต่อลิตร
6. 5020F2: 11.2 ± 0.12 กรัมต่อลิตร

- นำของผสมจากการหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแต่ละกรณีแต่ปริมาตร 400 มิลลิลิตร (V_1) ไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Super T21 centrifuge ด้วย Sorvall SL – 250T rotor ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที (4,746×g) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้ได้ตะกอนมวลชีวภาพที่มีปริมาตรสุดท้าย (V_X) ดังนี้

1. 5606D1: 10.0 มิลลิลิตร
2. 5606D2: 11.0 มิลลิลิตร
3. 5606F1: 17.5 มิลลิลิตร
4. 5606F2: 15.0 มิลลิลิตร
5. 5020F1: 22.5 มิลลิลิตร
6. 5020F2: 22.5 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ทำการคำนวณปริมาตรฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ สำหรับปรับความเข้มข้นของมวลชีวภาพเปียกให้เท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร
- คำนวณปริมาตรสุดท้ายจากสูตร $V_2 = C_1V_1/C_2$

  C_1 = ความเข้มข้นมวลชีวภาพแห้งเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

  C_2 = ความเข้มข้นมวลชีวภาพแห้งสุดท้าย (กรัมต่อลิตร)

  V_1 = ปริมาตรเริ่มต้นเท่ากับ 400 มิลลิลิตร

  V_2 = ปริมาตรสุดท้าย

  1. (6.0 ± 0.08 กรัมต่อลิตร)(400 มิลลิลิตร)/(120 กรัมต่อลิตร) = 20.0 ± 0.26 มิลลิลิตร
  2. (6.2 ± 0.01 กรัมต่อลิตร)(400 มิลลิลิตร)/(120 กรัมต่อลิตร) = 20.6 ± 0.03 มิลลิลิตร
  3. (6.0 ± 0.17 กรัมต่อลิตร)(400 มิลลิลิตร)/(120 กรัมต่อลิตร) = 20.0 ± 0.56 มิลลิลิตร
  4. (6.0 ± 0.02 กรัมต่อลิตร)(400 มิลลิลิตร)/(120 กรัมต่อลิตร) = 20.0 ± 0.06 มิลลิลิตร
  5. (12.8 ± 0.58 กรัมต่อลิตร)(400 มิลลิลิตร)/(120 กรัมต่อลิตร)= 42.6 ± 1.93 มิลลิลิตร
  6. (11.2 ± 0.12 กรัมต่อลิตร)(400 มิลลิลิตร)/(120 กรัมต่อลิตร)= 37.3 ± 0.40 มิลลิลิตร

- ดังนั้นต้องใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพิ่มเติมสำหรับมวลชีวภาพแต่ละชนิดดังนี้
- จาก $V_2 - V_X$ = ปริมาตรฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ต้องเติม

  1. 5606D1: 20.0 – 10.0 = 10.0 มิลลิลิตร
  2. 5606D2: 20.6 – 11.0 = 9.6 มิลลิลิตร
  3. 5606F1: 20.0 – 17.5 = 2.5 มิลลิลิตร
  4. 5606F2: 20.0 – 15.0 = 5.0 มิลลิลิตร
  5. 5020F1: 42.6 – 22.5 = 25.2 มิลลิลิตร
  6. 5020F2: 37.3 – 22.5 = 14.8 มิลลิลิตร

<u>ตรวจสอบการคำนวณ</u>

- จากสูตร $C_2 = C_1V_1/V_2$

  1. (6.0 ± 0.078 กรัมต่อลิตร)(400 มิลลิลิตร)/(20.0 มิลลิลิตร) = 120 ± 1.56 กรัมต่อลิตร
  2. (6.2 ± 0.010 กรัมต่อลิตร)(400 มิลลิลิตร)/(20.6 มิลลิลิตร) = 120 ± 0.19 กรัมต่อลิตร
  3. (6.0 ± 0.170 กรัมต่อลิตร)(400 มิลลิลิตร)/(20.0 มิลลิลิตร) = 120 ± 3.40 กรัมต่อลิตร
  4. (6.0 ± 0.020 กรัมต่อลิตร)(400 มิลลิลิตร)/(20.0 มิลลิลิตร) = 120 ± 0.40 กรัมต่อลิตร
  5. (12.8 ± 0.58 กรัมต่อลิตร)(400 มิลลิลิตร)/(42.6 มิลลิลิตร) = 120 ± 5.4 กรัมต่อลิตร
  6. (11.2 ± 0.12 กรัมต่อลิตร)(400 มิลลิลิตร)/(37.3 มิลลิลิตร) = 120 ± 1.3 กรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ทำการคำนวณปริมาตรมวลชีวภาพเปียกในหน่วยไมโครลิตร ที่ต้องเติมลงในขวดไบโอทรานส์-ฟอร์เมชั่นแล้วให้มีมวลชีวภาพความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 12.24 และ 24.48 กรัมต่อลิตร
- จากสูตร $V_2 = C_1V_1/C_2$

  C_1 = ความเข้มข้นมวลชีวภาพเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

  C_2 = ความเข้มข้นมวลชีวภาพในขวดไบโอทรานส์ฟอร์เมชั่น (กรัมต่อลิตร)

  V_1 = ปริมาตรมวลชีวภาพที่ต้องเติม (มิลลิลิตร)

  V_2 = ปริมาตรสารละลายในขวดไบโอทรานส์ฟอร์เมชั่นเท่ากับ 10.652 มิลลิลิตร
- กรณีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 12.24 กรัมต่อลิตร

  (V_1 มิลลิลิตร)(120 กรัมต่อลิตร)/(10.652 มิลลิลิตร) = 12.24 กรัมต่อลิตร

  V_1 = 1.087 มิลลิลิตร

  ดังนั้นต้องเติมมวลชีวภาพปริมาตร1,087 ไมโครลิตร

  <u>ตรวจสอบการคำนวณ</u>

  จากสูตร $C_1V_1/V_2 = C_2$

  (120 กรัมต่อลิตร)(1.087 มิลลิลิตร)/(10.652 มิลลิลิตร) = 12.24 กรัมต่อลิตร
- กรณีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 24.48 กรัมต่อลิตร

  (V_1 มิลลิลิตร)(120 กรัมต่อลิตร)/(10.625 มิลลิลิตร) = 24.48 กรัมต่อลิตร

  V_1 = 2.173 มิลลิลิตร

  ดังนั้นต้องเติมมวลชีวภาพปริมาตร 2,173 ไมโครลิตร

  <u>ตรวจสอบการคำนวณ</u>

  จากสูตร $C_1V_1/V_2 = C_2$

  (120 กรัมต่อลิตร)(2.173 มิลลิลิตร)/(10.652 มิลลิลิตร) = 24.48 กรัมต่อลิตร

2. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร

- ชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตมวล 24.50 กรัม
- ละลายของแข็งด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมปรับระดับความเป็นกรดด่าง
- ปรับระดับความเป็นกรดด่างให้ได้ 6.0 ด้วย สารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 5 โมลาร์ และสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 7 โมลาร์
- ปรับปริมาตรสุดท้ายของสารละลายให้ได้ 150 มิลลิลิตร

  <u>ตรวจสอบการคำนวณ</u>

  จากสูตร (m)(1/MW)(1/V) = C

  m = มวลโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (กรัม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

MW= มวลโมเลกุลโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 136.09 โมลต่อกรัม

V = ปริมาตรสารละลาย (ลิตร)

(24.50 กรัม)(1/136.09 โมลต่อกรัม)(1/0.150 ลิตร$^{-1}$) = 1.2 โมลาร์

3. การเตรียมสารละลายเบนซาลดีไฮด์ความเข้มข้น 1.75 โมลาร์ ในออกทานอล

- ชั่งเบนซาลดีไฮด์ 0.93 กรัม ลงในขวดไบโอทรานส์ฟอร์เมชั่นชุดที่ 1 ปรับปริมาตรด้วยออกทานอลให้ได้ 5 มิลลิลิตร (เติมออกทานอลประมาณ 4.2 มิลลิลิตร)
- นำไปเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมสารละลายไทอามีนไพโรฟอสเฟตและแมกนีเซียมเฮปต้าไฮเดรต

- ชั่งไทอะมีนไพโรฟอสเฟต (thiamine pyrophosphate, TPP) มวล 0.25 กรัม เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร
- ชั่งแมกนีเซียมเฮปต้าไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) มวล 0.135 กรัม เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2.5 มิลลิลิตร
- ผสมสารทั้งสองรวมกันจะได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิลิตร

<u>ตรวจสอบการคำนวณ</u>

[TPP] = (0.250 กรัม)(1/460 โมลต่อกรัม)(1/5 มิลลิลิตร$^{-1}$)(1,000 มิลลิลิตร/1 ลิตร)

= 0.108 โมลต่อลิตร

[Mg^{2+}] = (0.135 กรัม)(1/246.47 โมลต่อกรัม)(1/5 มิลลิลิตร$^{-1}$)(1,000 มิลลิลิตร/1 ลิตร)

= 0.110 โมลต่อลิตร

- กรณีความเข้มข้นมวลชีวภาพ 12.24 กรัมต่อลิตร

- เติมมวลชีวภาพปริมาตร 1,087 ไมโครลิตร คิดเฉพาะชั้นบัฟเฟอร์ 1,087/2 = 544 ไมโครลิตร
- ปริมาตรสุดท้ายของชั้นบัฟเฟอร์เท่ากับ 5.326 มิลลิลิตร
- หาปริมาตรสารละลาย TPP และ $MgSO_4.7H_2O$ ที่ต้องใช้จาก

<u>ปริมาตรสารละลาย TPP เข้มข้น</u>

(108 มิลลิโมลาร์)(x มิลลิลิตร)/(5.326 มิลลิลิตร) = 1 มิลลิโมลาร์

x = 0.0494 มิลลิลิตร

<u>ปริมาตรสารละลาย $MgSO_4.7H_2O$ เข้มข้น</u>

(110 มิลลิโมลาร์)(x มิลลิลิตร)/(5.326 มิลลิลิตร) = 1.02 มิลลิโมลาร์

x = 0.0494 มิลลิลิตร

ดังนั้นต้องเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เท่ากับ 5.326 - 0.544 – 0.0494 = 4.7326 มิลลิลิตร

<u>ตรวจสอบการคำนวณ</u>

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กรณีปริมาตรรวมเท่ากับ 4.7326 + 0.544 + 0.0494 = 5.326 มิลลิลิตร

[TPP] ในชั้นบัฟเฟอร์ = (108 มิลลิโมลาร์)(49.4 ไมโครลิตร)/(5,326 ไมโครลิตร)

= 1.00 มิลลิโมลาร์

[Mg^{2+}] ในชั้นบัฟเฟอร์ = (110 มิลลิโมลาร์)(49.4 ไมโครลิตร)/(5,326 ไมโครลิตร)

= 1.02 มิลลิโมลาร์

- กรณีความเข้มข้นมวลชีวภาพ 24.48 กรัมต่อลิตร

- เติมมวลชีวภาพปริมาตร 2,173 ไมโครลิตร คิดเฉพาะชั้นบัฟเฟอร์ 2,173/2 = 1,087 ไมโครลิตร
- ให้ปริมาตรสุดท้ายของชั้นบัฟเฟอร์เท่ากับ 5.326 มิลลิลิตร
- หาปริมาตรสารละลาย TPP และ $MgSO_4.7H_2O$ ที่ต้องใช้จาก

<u>ปริมาตรสารละลาย TPP เข้มข้น</u>

(108 มิลลิโมลาร์)(x มิลลิลิตร)/(5.326 มิลลิลิตร) = 1 มิลลิโมลาร์

x = 0.0494 มิลลิลิตร

<u>ปริมาตรสารละลาย $MgSO_4.7H_2O$ เข้มข้น</u>

(110 มิลลิโมลาร์)(x มิลลิลิตร)/(5.326 มิลลิลิตร) = 1.02 มิลลิโมลาร์

x = 0.0494 มิลลิลิตร

ดังนั้นต้องเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เท่ากับ 5.326 – 1.087 – 0.0494 = 4.1896 มิลลิลิตร

<u>ตรวจสอบการคำนวณ</u>

กรณีปริมาตรรวมเท่ากับ 4.1896 + 1.087 + 0.0494 = 5.326 มิลลิลิตร

[TPP] ในชั้นบัฟเฟอร์ = (108 มิลลิโมลาร์)(49.4 ไมโครลิตร)/(5,326 ไมโครลิตร)

= 1.00 มิลลิโมลาร์

[Mg^{2+}] ในชั้นบัฟเฟอร์ = (110 มิลลิโมลาร์)(49.4 ไมโครลิตร)/(5,326 ไมโครลิตร)

= 1.02 มิลลิโมลาร์

5. การเตรียมสารละลายไพรูเวตเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์

- ปริมาตรสุดท้ายของชั้นบัฟเฟอร์เท่ากับ 5.326 มิลลิลิตร
- คำนวณมวลโซเดียมไพรูเวต (sodium pyruvate)
- จากสูตร $C_1V_1/V_2 = C_2$

C_1 = ความเข้มข้นไพรูเวตเริ่มต้น (โมลต่อลิตร)

C_2 = ความเข้มข้นไพรูเวตสุดท้าย (โมลต่อลิตร)

V_1 = ปริมาตรไพรูเวตเริ่มต้น (มิลลิลิตร)

V_2 = ปริมาตรไพรูเวตสุดท้าย (มิลลิลิตร)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(C_1 โมล/ลิตร)(5/5.326) = 0.303 โมลาร์

C_1 = 0.3228 โมลต่อลิตร

- จากสูตร m(1/MW)(1/V) = C

  m = มวลโซเดียมไพรูเวต (กรัม)

  MW = มวลโมเลกุลโซเดียมไพรูเวต (โมลต่อกรัม)

  V = ปริมาตรสารละลาย (ลิตร)

  C = ความเข้มข้นสารละลาย (โมลต่อลิตร)

  (m กรัม)(1/110.04 โมลต่อกรัม)(1/0.005 ลิตร$^{-1}$) = 0.3228 โมลต่อลิตร

  m = 0.177 กรัม

- ชั่งโซเดียมไพรูเวตมวล 0.177 กรัม ใส่ขวดไบโอทรานส์ฟอร์เมชั่น ชุดที่ 2
- เก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

<u>ตรวจสอบการคำนวณ</u>

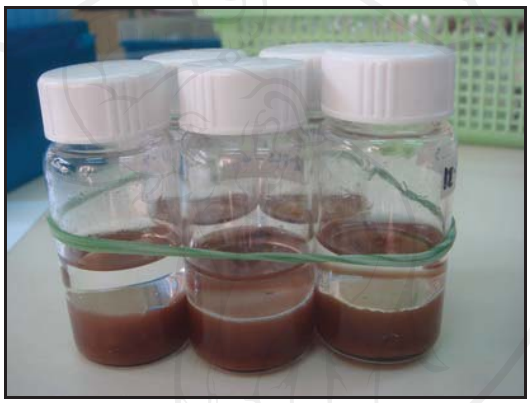
- สารละลายโซเดียมไพรูเวตปริมาตร 5 มิลลิลิตร มีความเข้มข้นเท่ากับ (0.177 กรัม)(1/110.04 โมลต่อกรัม)(1/0.005 ลิตร$^{-1}$) = 0.3228 โมลต่อลิตร
- ปริมาตรสุดท้ายของชั้นบัฟเฟอร์เท่ากับ 5.326 มิลลิลิตร จะมีความเข้มข้นของโซเดียมไพรูเวตเท่ากับ (0.3228 โมลต่อลิตร)(5/5.326) = 303 มิลลิโมลาร์

6. ขั้นตอนการทดลอง

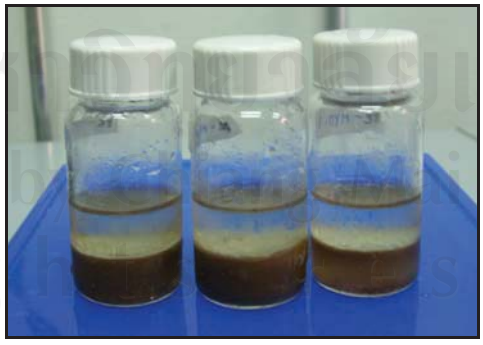
- เตรียมขวดไบโอทรานส์ฟอร์เมชั่นขนาด 30 มิลลิลิตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง × สูง = 2.6 × 5.9 เซนติเมตร^2) 2 ชุด สำหรับชั้นสารอินทรีย์ (ชุดที่ 1) และชั้นบัฟเฟอร์ (ชุดที่ 2) เมื่อทำการทดลองให้เทสารชั้นบัฟเฟอร์ลงในขวดไบโอทรานส์ฟอร์เมชั่นที่บรรจุสารชั้นอินทรีย์ เพื่อป้อง กันความคลาดเคลื่อนเนื่องจากชั้นสารอินทรีย์มีเบนซาลดีไฮด์ ที่มักเกาะติดผิวเครื่องแก้วเป็นองค์ประกอบ
- เตรียมสารละลายเบนซาลดีไฮด์ความเข้มข้น 1.75 โมลาร์ ในออกทานอลใส่ขวดไบโอทรานส์-ฟอร์เมชั่น ชุดที่ 1 แล้วเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส
- เตรียมสารละลายเข้มข้น TPP และ $MgSO_4.7H_2O$ เก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส
- ชั่งโซเดียมไพรูเวตมวล 0.177 กรัม ใส่ในขวดไบโอทรานส์ฟอร์เมชั่นชุดที่ 2 เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- เตรียมมวลชีวภาพเปียกที่ความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร
- เติมสารละลาย TPP และ $MgSO_4.7H_2O$ และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ลงไปในขวดไบโอ-ทรานส์ฟอร์เมชั่นชุดที่ 2 เพื่อละลายโซเดียมไพรูเวต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- จากนั้นเทสารละลายในขวดชุดที่สองลงในขวดไบโอทรานส์ฟอร์เมชั่นชุดที่ 1 แล้วแกว่งขวดในแนวระดับ
- เติมมวลชีวภาพเปียกลงในขวดไบโอทรานส์ฟอร์เมชั่นที่บรรจุสารละลายทั้งสองชั้น โดยเติมลงไปในชั้นบัฟเฟอร์ (ชั้นล่าง)
- นำขวดไบโอทรานส์ฟอร์เมชั่นไปแกว่งในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 6 - 8 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง
- ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการจุ่มขวดลงในไนโตรเจนเหลว



ภาพ ฑ.1 ขวดทดลองกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์เมชั่นระบบของเหลวสองชั้นแบบแยกชั้นก่อนการทดลอง



ภาพ ฑ.2 ขวดทดลองกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์เมชั่นระบบของเหลวสองชั้นแบบแยกชั้นหลังการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – สกุล นางสาวสุรีย์ อาชวะสมิต

วัน เดือน ปี เกิด 6 กันยายน 2527

การศึกษา ปี 2544
มัธยมศึกษาตอนปลาย
โรงเรียนมงฟอร์ตวิทยาลัย แผนกมัธยม จังหวัดเชียงใหม่

ปี 2549
สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved