บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

อุปกรณ์	รูปแบบ (model)	บริษัทหรือหน่วยงานผู้ผลิต
ตู้บ่ม (incubator)	B-30	Memmert, West Germany
ตู้อบ (hot air oven)	-	Prolabo, Japan
เครื่องเขย่า (rotary shaker)	ประกอบขึ้นเอง	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (shaking water bath)	Heto	DT. Hetotherm, Japan
เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด	A 200S	Sartorius Gmbh, West Germany
เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)	UV.240	Shimadsu corporation, Japan
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)	Varifuge	Heraeus, Christ Wast Germany
เครื่องผสมเวอร์เทกซ์ (Vortex mixer)	Cat. No. 1291 Super mixer	Lab-Line Instrument U.S.A.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์	รูปแบบ (Model)	บริษัทหรือหน่วยงานผู้ผลิต
เครื่องวัดพีเอช (pH meter)	pH meter 220	Corning, U.S.A.
ปั๊มดูดอากาศ (suction pump)	GAST	GAST, U.S.A.
ตะแกรงร่อนขนาด 40 และ 60 เมช	ASTM	Retsch, West Germany
เครื่องย่อยโปรตีน	Kjeldatherm	Garhardt, West Germany
เครื่องกลั่นโปรตีน	Vapodest 1	Garhardt, West Germany
ตู้แช่แข็ง	Rotary freezer	Mitsubishi, Japan
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)	SS-320 Steam Sterilizer	TOMY SEIKO Co.,Ltd Tokyo, Japan
เครื่องบด (Disc Miller)	-	IDRC.
เครื่องแช่เยือกแข็งแห้ง (Freeze dryer)	25-SRC	The VIRTIS Company GARDINER, New york

3.2 <u>วัสดุและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย</u>

- ฟางข้าว อำเภอ บางพลี จังหวัด สมุทรปราการ
- กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (Whatman Ltd., Springfield Mill, Maidstone Kent, England)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Famitalia Carlo Erba)
- กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Fluka Shemie Ag., Switzerland)
- คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (Fluka Shemie Ag., Switzerland)

- ซาลิซิน (Sigma St. Louis, U.S.A.)
- กลูโคสแอนไฮดรัส (Merck Chemical Company)
- กรดบอริค (Merck Chemical Company)
- กรดซัลฟูริค (Riedel-de Haen Ag Seelze-Hannover)
- โปรแตสเซียม โซเดียมตาร์เตรต (Merck Chemical Company)
- คอปเปอร์ซัลเฟต (BDH Chemical Ltd. Poole England)
- แอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (BDH Chemical Ltd. Poole England)
- โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (BDH Chemical Ltd. Poole England)
- ไดโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Merck Chemical Company)
- กรดอะซิติก (Merck Chemical Company)
- โซเดียมอะซิเตตไตรไฮเดรต (Fluka Shemie Ag., Switzerland)
- โซเดียมไบคาร์บอเนต (Riedel-de Haen Ag Seelze-Hannover)
- Folin-Ciacalteas (Merck Chemical Company)
- กรดซิตริก (Merck Chemical Company)
- ไตรโซเดียมซิเตรตไดไฮเดรต (Famitalia Carlo Erba)
- โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (Riedel-de Haen Ag Seelze-Hannover)
- ฟีนอล (Famitalia Carlo Erba)
- เซลลูโลส (Sigma St. Louis, U.S.A.)
- สารเคมีอื่น ๆ ซึ่งเป็นชนิด laboratory grade จาก บริษัท May & Baker Ltd. Dagenham England, บริษัท BDH Chemical Ltd. Poole England, บริษัท Sigma St. Louis, U.S.A., บริษัท Merck Chemical Company., บริษัท Fluka Chemie Ag., Switzerland

3.3 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

3.3.1 *Cellulomonas* sp. TISTR 368 เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง (Nutrient agar (NA) slant) บ่มที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บที่

อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อทุก ๆ เดือน

3.3.2 *Alcaligenes faecalis* TISTR 38 เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง (NA slant) บ่มที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อทุก ๆ เดือน

3.3.3 *Trichoderma viride* TISTR 3160 เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง (Potato dextrose agar (PDA) slant) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 5-7 วัน เก็บที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสถ่ายเชื้อทุก ๆ เดือน

3.3.4 *Candida utilis* TISTR 5001 เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง(Sabouraud dextrose agar slant) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมงเก็บที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อทุก ๆ เดือน

จุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.4 การตรวจสอบลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์

3.4.1 *Cellulomonas* sp.

นำเชื้อแบคทีเรียจากที่เก็บตาม 3.3.1 มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (NA)ในจานเพาะเชื้อ บ่มที่ 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ศึกษาลักษณะเซลล์ โดยการย้อมสีแบบแกรมและส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.4.2 *Alcaligenes faecalis*

นำเชื้อแบคทีเรียจากที่เก็บตาม 3.3.2 มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (NA)ในจานเพาะเชื้อ บ่มที่ 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ศึกษาลักษณะเซลล์ โดยการย้อมสีแบบแกรมและส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.4.3 *Trichoderma viride*

นำเชื้อราจากที่เก็บตาม 3.3.3 มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (PDA) ในจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ศึกษาลักษณะสปอร์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.4.4 *Candida utilis*

นำเชื้อยีสต์จากที่เก็บตาม 3.3.4 มา streak ถ่ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Sabouraud dextrose agar) ศึกษาลักษณะเซลล์โดยส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.5 การเตรียมเซลล์สำหรับเป็น inoculum

3.5.1 การเตรียมเซลล์ *Cellulomonas* sp.

นำ *Cellulomonas* sp. จากที่เก็บรักษาตาม 3.3.1 ถ่ายเซลล์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เวลา 2 วัน ใช้ลูปเขี่ยโคโลนีใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำเปปโตนเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข.) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.18 ซึ่งมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.5.2 การเตรียมเซลล์ *A. faecalis*

นำ *A. faecalis* จากที่เก็บรักษาตาม 3.3.2 ถ่ายเซลล์ลงอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เวลา 2 วัน ใช้ลูปเขี่ยโคโลนีใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำเปปโตนเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.15 ซึ่งมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.5.3 การเตรียมสปอร์ของ *T. viride*

นำ *T. viride* ที่เก็บรักษาตามวิธีการ 3.3.3 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเวลา 7 วัน ใส่น้ำกลั่นที่ผ่านมานึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ ใช้ลูปเขี่ยสปอร์ให้หลุดออกมาแขวนลอยในน้ำ กรองสปอร์แขวนลอยผ่านที่กรองสปอร์ (filter tube) (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข.) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อแยกส่วนของสายใยออกนำสปอร์ที่กรองได้มาแขวนลอยในน้ำและนับสปอร์เริ่มต้นให้อยู่ในช่วง 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ hemacytometer (วิธีใช้แสดงในภาคผนวก ข.)

3.5.4 การเตรียมเซลล์ *C. utilis*

นำยีสต์ *C. utilis* จากที่เก็บรักษาตามวิธีการ 3.3.4 ถ่ายลงบนวุ้นแข็งเอียง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ลูปเขี่ยเชื้อยีสต์ลงใน 50 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Sabouraud dextrose broth) ในขวดแก้วทรงกรวย (erlenmeyer flask)

ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว บ่มบนเครื่องเขย่าแบบ หมุนวน ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 16 ชั่วโมง แยกเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 1,500xg เวลา 30 นาที แยกส่วนที่เป็นเซลยีสต์ล้างด้วยน้ำเกลือ (normal saline) (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข.) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วและผสมกับน้ำเกลือที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ในอัตราส่วน 1:10 โดยปริมาตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ให้ ได้ค่าเท่ากับ 0.4 ซึ่ง 1 มิลลิลิตรจะมียีสต์ประมาณ 10^8 เซลล์

3.6. ฟางข้าว

3.6.1 การเตรียมฟางข้าว

นำฟางข้างมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาหลายๆ ครั้ง ตากแดดให้แห้ง อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท นำมาบดด้วยเครื่องบด (disc miller) โดยบดผ่านตะแกรงที่มีรูขนาด 0.5 มิลลิเมตร และนำมาร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 40 เมช

3.6.2 การย่อยฟางข้าวขั้นต้น

นำฟางข้าวที่ผ่านการบด และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 เมช ผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 เปอร์เซนต์ในอัตราส่วนฟางข้าวต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 1:20 โดยน้ำหนัก อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที (Han และ Callihan, 1974) เทส่วนผสมผ่านผ้าบางและล้างฟางข้าวด้วยน้ำประปาจนอุณหภูมิลดลง ปรับค่าพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกจนพีเอชเป็นกลาง ล้างด้วยน้ำประปากรองด้วยผ้าบาง จนน้ำที่ใช้ล้างใส นำไปอบแห้งที่ตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 80-100 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท บดด้วยเครื่องบดชนิดเดียวกันกับ 3.6.1

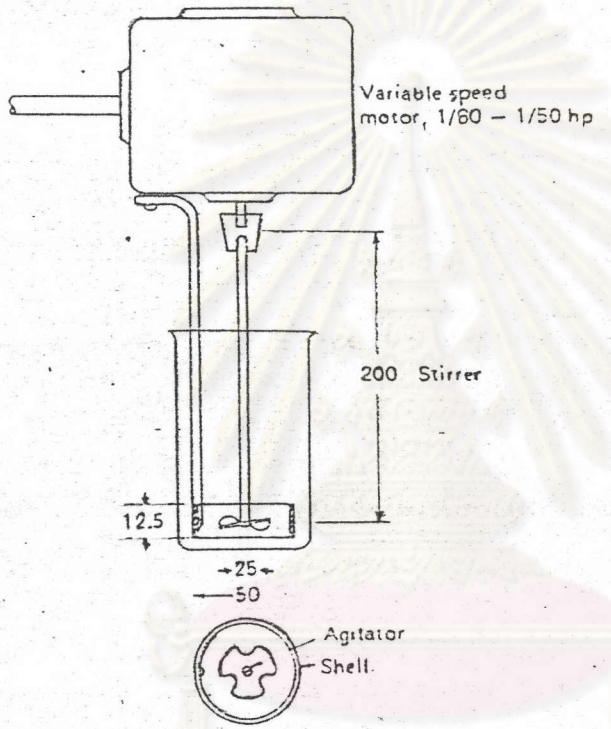
3.6.3 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของฟางข้าว

นำฟางข้าวที่ผ่านการเตรียมขั้นต้นแล้วจาก 3.6.2 มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีโดย แผนกเยื่อและกระดาษ กรมวิทยาศาสตร์บริการ

3.6.3.1 วิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส

เตรียมอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ ดังรูป 8 แล้ววัดปริมาณเซลลูโลสโดยใช้ตัวอย่างฟางข้าว 1.5 กรัมใส่บีกเกอร์ขนาด 300 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 7.5 เปอร์เซนต์ จำนวน 75 มิลลิลิตร คนสารละลายด้วยใบพัดกวน (agitator) จนฟางข้าวกระ

จายตัวไปทั่วสายละลาย ยกใบพัดกวนออกล้างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 17.5 เปอร์เซนต์ จำนวน 25 มิลลิลิตร แล้วคนซ้ำด้วยแท่งแก้วคน ทิ้งในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันทิ้งไว้ 30 นาที ถ่ายใส่กรวยแยกแยกส่วนตะกอนออกทีละ 10 มิลลิลิตร จนครบ 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วทรงกรวยใบใหม่นำไปหาปริมาณเซลลูโลส ดังนี้



รูปที่ 8 เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส

3.6.3.1.1 แอลฟาเซลลูโลส

โดยนำส่วนที่กรองได้ 25 มิลลิลิตร ใส่ขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 0.5 นอร์มัล โปตัสเซี่ยมไดโครเมต จำนวน 10 มิลลิลิตร เขย่าเป็นวงกลมพร้อมกับเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 50 มิลลิลิตร อย่างช้า ๆ ทิ้งไว้ 15 นาที เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติมอินดิเคเตอร์เฟอร์โรอิน 2-4 หยด ไตเตรทด้วยสารละลาย เฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนเกิดสีม่วงจิงหยุด

8 แล้วนำค่า (ปริมาณของเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต) ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณแอลฟาเซลลูโลส

3.6.3.1.2 เบต้าและแกมมาเซลลูโลส

โดยนำส่วนที่กรองได้ 50 มิลลิลิตร ใส่กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 50 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันนำไปต้มในน้ำร้อนอุณหภูมิ 70 ถึง 90 องศาเซลเซียสเวลา 2-3 นาที เพื่อให้เบต้าเซลลูโลสตกตะกอน แยกสารละลายใสมา 50 มิลลิลิตร และเติมโปตัสเซี่ยมไดโครเมตเข้มข้น 0.5 นอร์มัล จำนวน 10 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 90 มิลลิลิตร ช้า ๆ ทิ้งไว้ 15 นาที ไตเตรทด้วยสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนเกิดสีม่วง แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณเบต้าและแกมมาเซลลูโลส

3.6.3.1.3 การคำนวณ

$$\text{แอลฟาเซลลูโลส (\%)} = \frac{100 - 6.85\,(V_2 - V_1) \times N \times 20}{A \times W}$$

เมื่อ V_1 = มิลลิลิตรของการไตเตรตตัวอย่างฟางข้าว

V_2 = มิลลิลิตรของการไตเตรตตัวอย่างควบคุม

N = ความเข้มข้นเป็นนอร์มัลของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต

A = มิลลิลิตรของส่วนที่กรองได้

W = น้ำหนักแห้งของฟางข้าวเป็นกรัม

$$\text{แกมมา เซลลูโลส (\%)} = \frac{6.85\,(V_2 - V_1) \times N \times 20}{25 \times W}$$

$$\text{เบต้า เซลลูโลส (\%)} = 100 - (\text{แอลฟาเซลลูโลส (\%)} + \text{แกมมาเซลลูโลส (\%)})$$

3.6.3.2 วิเคราะห์ปริมาณลิกนิน

นำตัวอย่างฟางข้าว 2 กรัม ใส่บีกเกอร์ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 72 เปอร์เซนต์ 40 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งแก้ว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส หลังจากฟางข้าว

กระจายตัวในสารละลายแล้วปิดบีกเกอร์ด้วยฝาแก้ว เก็บในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง คนเป็นระยะ ๆ เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว เติมน้ำกลั่น 300-400 มิลลิลิตร ลงไปในขวดแก้วทรงกรวยและถ่ายฟางข้าวลงในขวดแก้วล้างและทำให้กรดซัลฟูริกเจือจางเพียง 3 เปอร์เซนต์ ซึ่งมีปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 1,540 มิลลิลิตร ต้มสารละลายนี้ 4 ชั่วโมง โดยรักษาปริมาณให้คงที่ด้วยการใช้ reflux condensor ทิ้งให้ลิกนินมตกตะกอน แยกส่วนที่เป็นของเหลวและตะกอนลิกนินออกโดยการกรอง ล้างลิกนินด้วยน้ำร้อน ทำให้แห้งที่ 105 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักคำนวณหาปริมาณลิกนินจากสูตร

$$\% \text{ ลิกนิน} = \frac{A \times 100}{W}$$

เมื่อ

A = น้ำหนักของลิกนิน (กรัม)

W = น้ำหนักของตัวอย่างแห้ง (กรัม)

3.6.3.3 วิเคราะห์ปริมาณเฮมิเซลลูโลส

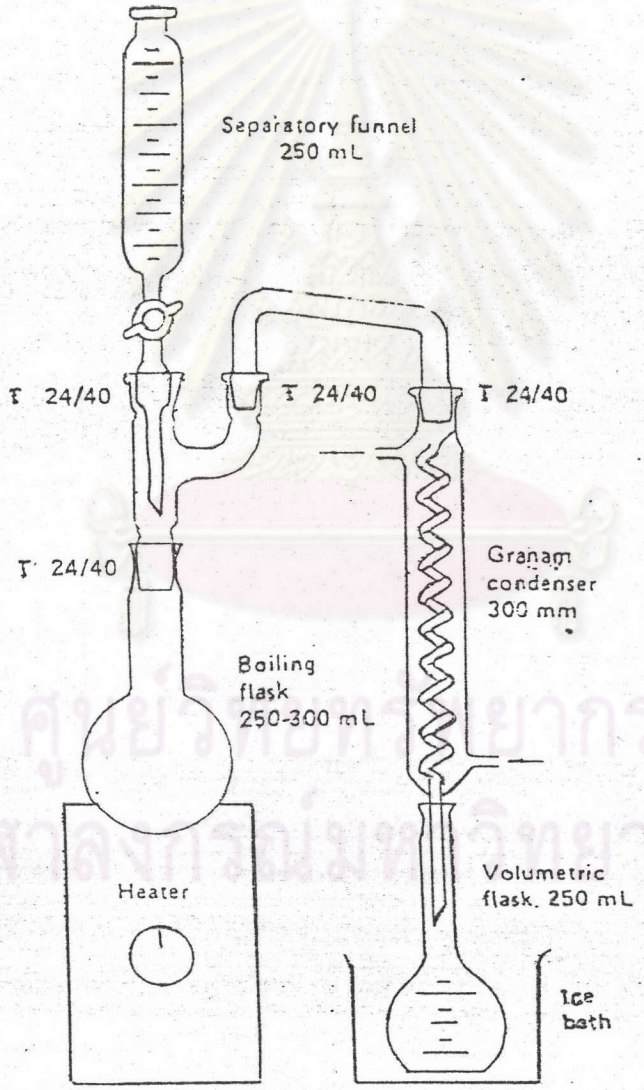
นำตัวอย่างฟางข้าว 3-5 กรัม ใส่ขวดทรงกรวยเติมโซเดียมคลอไรด์ จำนวน 20 กรัม และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3.85 นอร์มัล จำนวน 100 มิลลิลิตร ต้มโดยใช้อุปกรณ์ดังรูปที่ 8 โดยทำเครื่องหมายระดับกรดบนขวดแก้วทรงกรวย เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3.85 นอร์มัล 250 มิลลิลิตร ใส่ในกรวยแยก ปรับอุณหภูมิและกลั่นด้วยอัตราเร็ว 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที รวบรวมสารละลายที่กลั่นได้ในขวดวัดปริมาตรที่แช่ในน้ำแข็งตลอดเวลา (ระหว่างการกลั่นปรับปริมาตรของขวดให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ตลอดเวลาโดยเติมกรดไฮโดรคลอริกจากกรวยแยก)กลั่นจนได้สารละลาย ประมาณ 225$\pm$10 มิลลิลิตร เมื่อได้สารละลายครบแล้วเติมกรดไฮโดรคลอริก จนมีปริมาตรรวม 250 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน นำมา 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลาย ออซินอล (orcinol reagent) 25 มิลลิลิตร ผสมและแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 60 นาที เติมเอธานอลจนมีปริมาตรครบ 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแช่ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความ

ยาวคลื่น 630 นาโนเมตร ค่าที่ได้คือ ปริมาณของไซแลนเป็นมิลลิกรัมคำนวณหาเฮมิเซลลูโลส จาก

$$\text{เฮมิเซลลูโลส (\%)} = \frac{A}{10W}$$

เมื่อ A = มิลลิกรัมของไซแลน

W = น้ำหนักแห้งของฟางข้าว (กรัม)



รูปที่ 9 เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเฮมิเซลลูโลส

3.7 การหมักฟางข้าวด้วยเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

3.7.1 *Cellulomonas* sp. และ *A. faecalis*

3.7.1.1 การหมักฟางข้าวด้วยเชื้อ *Cellulomonas* sp.

นำฟางข้าวที่ผ่านการเตรียมขั้นต้นตามวิธีการเตรียมข้อ 3.6.2 จำนวน 1 กรัม ใส่ในขวดแก้วทรงกรวย ขนาด 250 มิลลิลิตรเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Han และ Callihan, 1974) 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.6 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 psiเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นอุณหภูมิห้องเติมเชื้อ *Cellulomonas* sp. ตามวิธีการข้อ 3.3.1 ลงไป 1 มิลลิลิตร (จำนวนเซลล์ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนวน อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส, โปรตีนของฟางข้าวหมัก, น้ำตาลรีดิวซ์, soluble protein และ พีเอช ที่ช่วงระยะเวลาต่าง ๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน ทดลองสามซ้ำ

3.7.1.2 การหมักฟางข้าวด้วย *Cellulomonas* sp. และ *A. faecalis*

ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.7.1.1 แต่เติม *A. faecalis* ที่ปรับจำนวนเซลล์ให้เท่ากับ 10^7 เซลต่อมิลลิลิตร ตามวิธีการข้อ 3.3.2 พร้อมกับ *Cellulomonas* sp. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนวน ที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส, โปรตีนของฟางข้าวหมัก, น้ำตาลรีดิวซ์, soluble protein และ พีเอช ที่ช่วงระยะเวลาต่าง ๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน ทดลองสามซ้ำ

3.7.1.3 การหมักฟางข้าวด้วยเชื้อ *Cellulomonas* sp. และ *Cellulomonas* sp. ร่วมกับ *A. faecalis* และควบคุมพีเอชที่ 6.6 ด้วย buffer medium

ทดลองเช่นเดียวกับ 5.1.1 และ 5.1.2 แต่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์พีเอช 6.6 ลงไปแทนน้ำกลั่น เก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส,โปรตีนของฟางข้าวหมัก, น้ำตาลรีดิวซ์, soluble protein และ พีเอช ที่ช่วงระยะเวลาต่าง ๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน ทดลองสามซ้ำ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7.2 การหมักฟางข้าวด้วยเชื้อ *T. viride* และ *C. utilis*

3.7.2.1 การหมักฟางข้าวด้วยเชื้อ *T. viride*

นำฟางข้าวที่ผ่านการเตรียมขั้นต้นตามวิธีการเตรียมข้อ 3.6.2 จำนวน 1 กรัม ใส่ขวดแก้วรูปทรงกรวย ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Czapek's dox media (Mandels และ Weber, 1969) จำนวน 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.3 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 psiเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติมเชื้อรา *T. viride* ตามวิธีการข้อ 3.3.3 ลงไป 1 มิลลิลิตร (จำนวนสปอร์ประมาณ 10^7 สปอร์) บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนวน ที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 10 วันเก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส, โปรตีนของฟางข้าวหมัก, น้ำตาลรีดิวซ์, soluble protein และพีเอชที่ช่วงระยะเวลาต่าง ๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน ทดลองสามซ้ำ

3.7.2.2 การหมักฟางข้าวด้วยเชื้อ *T. viride* กับ *C. utilis*

ทดลองเช่นเดียวกับ 3.7.2.1 แต่หลังจากบ่มตัวอย่างบนเครื่องเขย่าเวลา 24 ชั่วโมงแล้วเติมยีสต์ *C. utilis* ที่ปรับจำนวนแล้วตามข้อ 3.4 ลงไป 1 มิลลิลิตร (ประมาณ 10^8 เซลล์) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนวน ที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส, โปรตีนของฟางข้าวหมัก, น้ำตาลรีดิวซ์, soluble protein และพีเอช ที่ช่วงระยะเวลาต่าง ๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ10 วัน ทดลองสามซ้ำ

3.7.2.3 การหมักฟางข้าวด้วยเชื้อ *T. viride* และ *T. viride* ร่วมกับ *C. utilis* และควบคุมพีเอชที่ 5.3 ด้วย buffer medium

ทำการทดลองเช่นเดียวกับ ข้อ 3.7.2.1 และ 3.7.2.2 แต่เติมซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.3 ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแทนการใช้น้ำกลั่น นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส, โปรตีนของฟางข้าวหมัก, น้ำตาลรีดิวซ์, soluble protein และพีเอช ที่ช่วงระยะเวลาต่าง ๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ10 วัน ทดลองสามซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

i17155113

3.8. การตรวจสอบแอคติวิตีของเซลลูเลสของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

3.8.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์

นำตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงตามวิธีการข้อ 3.7.1.1, 3.7.1.2, 3.7.1.3, 3.7.2.1, 3.7.2.2 และ 3.7.2.3 ที่บ่มบนเครื่องเขย่าจนครบกำหนดเวลาแล้ว มาแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ 1500xg เวลา 45 นาที แยกส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อใสมาตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส

3.8.2 การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส

3.8.2.1 การตรวจสอบแอคติวิตีของเซลลูเลสรวม (Cellulase activity)

โดยวิธีของ Mandels, Andreotti และ Roche (1976) ผสมและบ่มเอนไซม์ที่ได้ 0.5 มิลลิลิตรกับสารละลายสับสเตรทที่ประกอบด้วย ซิเตรทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.3 จำนวน 1 มิลลิลิตร (แบคทีเรียใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.6) และกระดาษกรอง whatman No. 1 ขนาดเล็ก น้ำหนัก 50 มิลลิกรัม โดยบ่มสับสเตรทก่อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที แล้วเติมสารละลายเอนไซม์ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายใส 1 มิลลิลิตร มาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid) (Miller, 1959) ตามวิธีการข้อ 3.8.3

กำหนดให้ 1 หน่วย (unit) ของเซลลูเลสรวม หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสลายกระดาษกรอง แล้วได้น้ำตาลรีดิวส์เทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครกรัมต่อนาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดลอง

3.8.2.2 การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนโดกลูคาเนส

โดยวิธีของ Ryu และ Mandels (1980) ผสมและบ่มสารละลายเอนไซม์จำนวน 0.5 มิลลิลิตร กับสารละลายคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสเข้มข้น 1เปอร์เซนต์จำนวน 1.0 มิลลิลิตรใน สารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.5 โมลาร์พีเอช 5.3 (แบคทีเรียใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.6) ที่ผ่านการบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที แล้ว เติมสารละลายเอนไซม์ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 45 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที นำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้น โดยวิธีกรดไดไนโตรซาลิไซลิก

ตามวิธีการข้อ 3.8.3

กำหนดให้ 1 หน่วย (unit) ของเอนโดกลูคาเนส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสลายคาร์บอกซิเมทธิลเซลลูโลส แล้วได้น้ำตาลรีดิวส์ เทียบเท่ากลูโคส 1 ไมโครกรัมต่อนาทีภายใต้ภาวะที่ทดลอง

3.8.2.3 การตรวจสอบแอคติวิตีของเบต้า-กลูโคซิเดส

โดยวิธีของ Ryu and Mandels (1980) ผสมเอนไซม์ที่สกัดได้ 0.5 มิลลิลิตรกับ 1.0 มิลลิลิตร ของสารละลาย ซาลิซิน 0.5 เปอร์เซนต์ ใน ซิเตรทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.5 โมลาร์พีเอช 5.3 (แบคทีเรียใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์พีเอช 6.6) ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเวลา 5 นาที แล้วจึงเติมสารละลายเอนไซม์ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือดเวลา 5 นาที นำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิด โดยวิธีกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ตามวิธีการข้อ 3.8.3

กำหนดให้ 1 หน่วย (unit)ของเบต้ากลูโคซิเดส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสลายซาลิซินแล้วได้น้ำตาลรีดิวส์ เทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครกรัมต่อนาทีภายใต้ภาวะทดลอง

3.8.2.4 การตรวจสอบแอคติวิตีของเอกโซกลูคาเนส

โดยวิธีของ Tanaka และคณะ (1980) ผสมและบ่มเอนไซม์ที่สกัดได้กับ 10 มิลลิลิตร ของเซลลูโลสเข้มข้น 1.10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอะซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์พีเอช 5.3 (แบคทีเรียใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์พีเอช 6.6) ที่ผ่านการบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที โดยการเขย่าต่อเนื่องแล้วเติมสารละลายเอนไซม์ผสมให้เข้ากัน ในขวดแก้วรูปทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าแบบ หมุนวน หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือดเวลา 5 นาที นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 1500 xg ใช้เวลา 10 นาที วัดน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้น โดยวิธีกรดไดไนโตรซาลิไซนิก ตามวิธีการข้อ 3.8.3

กำหนดให้ 1 หน่วย (unit) ของ เอกโซกลูคาเนส หมายถึง ปริมาณ ของเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสแล้วได้น้ำตาลรีดิวส์เทียบเท่ากลูโคส 1 ไมโครกรัมต่อชั่วโมง ภายใต้ภาวะทดลอง

3.8.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์

โดยวิธีของ Miller (1959) นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA) (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข.) จำนวน 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำเย็นจัดเติมน้ำยาจัดไอออน 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร สำหรับกราฟมาตรฐานใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 10-70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.9 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีลอว์รี</u> (Lowry และคณะ, 1951)

โดยใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดหาปริมาณโปรตีน (หรือ soluble protein) 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (ภาคผนวก ข.) 5.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เติมสารละลายฟีนอลรีเอเจนต์ (ภาคผนวก ข.) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เกิดสีที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 740 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณโปรตีนของสารละลายตัวอย่างโดยเปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นจากสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ตั้งแต่ 0.1-0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.10 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen)</u>

นำตัวอย่างที่ได้จากการหมักฟางข้าวตามวิธีการข้อ 3.7.1 และ 3.7.2 ไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 1500xg เวลา 30 นาที แยกส่วนที่เป็นตะกอน ซึ่งประกอบด้วยเศษฟางข้าวหมักจุลินทรีย์ที่สัมผัสอยู่กับฟางข้าว นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนแห้งแล้วนำมาหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธี Semi-micro Kjeldahl Distillation (โดยใช้สารเคมีที่เตรียมในภาคผนวก ข.) ซึ่งคำนวณหาปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมดได้จากการคำนวณโดยสูตร

$$\text{ไนโตรเจนทั้งหมด (\%)} = \frac{(a-b)\ N \times 100 \times 0.014}{C}$$

เมื่อ a = ปริมาณกรดซัลฟูริกมาตรฐานที่ใช้กับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

b = ปริมาณกรดซัลฟูริกมาตรฐานที่ใช้กับตัวควบคุม (มิลลิลิตร)

c = น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

N = ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกมาตรฐาน (Normality)

ซึ่งสามารถคำนวณหาปริมาณโปรตีนได้จากค่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด คูณด้วย 6.25

3.11 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและปริมาณกรดอะมิโนของผลผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

3.11.1 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและปริมาณกรดอะมิโนของ *Cellulomonas* sp. และ *Cellulomonas* sp. ร่วมกับ *A. faecalis*

นำตัวอย่างที่ได้จากการหมักฟางข้าวด้วย *Cellulomonas* sp. และ *Cellulomonas* sp. ร่วมกับ *A. faecalis* มาตั้งไว้ให้ตะกอนฟางข้าวหมักตกลงสู่ด้านล่างของภาชนะ ใช้ปิเปตดูดแยกส่วนที่เป็นของเหลวออกแล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 นำส่วนที่ผ่านการกรองแล้วไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 1500xg เวลา 30 นาที แยกส่วนที่เป็นตะกอนออกแล้วนำไปทำแห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer นำไปวิเคราะห์ดังนี้

3.11.1.1 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

โดยวิธี Semi-micro Kjeldahl Distillation

3.11.1.2 วิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน

โดยเครื่อง amino acid analyzer

3.11.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและปริมาณกรดอะมิโนของ *T. viride* และ *T. viride* ร่วมกับ *C. utilis*

นำตัวอย่างที่ได้จากการหมักฟางข้าวด้วย *T. viride* และ *T. viride* รวมกับ *C. utilis* ไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 1500xg เวลา 30 นาที แยกส่วนที่เป็นตะกอนออกแล้วนำไปทำแห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer นำไปวิเคราะห์ดังนี้

3.11.2.1 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

โดยวิธี Semi-micro Kjeldahl Distillation

3.11.2.2 วิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน

โดยเครื่อง amino acid analyzer

3.12 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนของโปรตีนเซลล์เดียวที่ผ่านการสกัด

3.12.1 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนของ *Cellulomonas* sp. และ *A. faecalis* ที่ผ่านการสกัด

นำตัวอย่างจากการหมักฟางข้าวด้วย *Cellulomonas* sp.กับ *A. faecalis* มาแยกเซลล์ออกจากฟางข้าวด้วยวิธีการเดียวกับ 3.11.1 นำไปทำแห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer จากนั้นนำมาผสมกับสารละลายไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 9.7 ในอัตราส่วนเซลล์แห้งต่อสารละลายไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ เท่ากับ 1:10 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเวลา 2 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ 1500xg เวลา 30 นาที แยกสารละลายใสเก็บไว้ ส่วนตะกอนนำไปผสมกับสารละลายไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 9.7 และทำซ้ำตามวิธีเดิม 3-4 ครั้ง รวมสารละลายใสมาตกตะกอนด้วย กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.0 นำไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ 1500xg เวลา 30 นาที แยกส่วนที่เป็นตะกอนมาผสมกับน้ำกลั่น ปรับพีเอชจนเป็นกลาง (Tannenbaum, Mateles และ Capco, 1966) นำไปวิเคราะห์

3.12.1.1 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

โดยวิธี Semi-micro Kjeldahl Distillation

3.12.1.2 วิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน

โดยเครื่อง amino acid analyzer

3.12.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนของ *T. viride* กับ *C. utilis* ที่ผ่านการสกัด

นำตัวอย่างจากการหมักฟางข้าวด้วย *T. viride* กับ *C. utilis* จากวิธีการข้อ 3.11.2 นำไปทำแห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer จากนั้นนำมาผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 4.0 เปอร์เซนต์ พีเอช 11.5 ในอัตราส่วน 1:10 บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 1500xg 30 นาที แยกส่วนสาร

ละลายใสเก็บไว้ ส่วนตะกอนนำไปผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 4.0 เปอร์เซนต์ พีเอช 11.5 และทำซ้ำตามวิธีเดิม 3-4 ครั้ง รวบรวมสารละลายใสมาตกตะกอนด้วย กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ปรับพีเอชให้เท่ากับ 4 นำไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 1500xg 30 นาที แยกส่วนตะกอนมาผสมกับน้ำกลั่นปรับพีเอชจนเป็นกลาง (Vananuvat และ Kinsella, 1975) แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หา

3.12.2.1 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

โดยวิธี Semi-micro Kjeldahl Distillation

3.12.2.2 วิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน

โดยเครื่อง amino acid analyzer

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย