บทที่ 2

อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น G-10 แบบ rotary ของบริษัท New Brunswick Scientific , USA.

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (controlled environmental incubator shaker) รุ่น G-25R แบบ rotary ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA.

เครื่องเขย่า (shaker) แบบ rotary ของบริษัท Takasaki Kagaku Kikai., Japan.

เครื่องเขย่า (shaker) แบบ rotary ของศูนย์เครื่องมือ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (controlled environmental incubator shaker) รุ่น G-27 แบบ reciprocal ของบริษัท New Brunswick Scientific , USA.

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ(aquatherm water bath shaker) รุ่น R-86 แบบ reciprocal ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA.

เครื่องรีฟริเจเรเทดเซนตริฟิวจ์ (refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman, USA.

เครื่องเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) รุ่น KS-3000P ของบริษัท Kubota, Japan.

เครื่องสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, USA.

เครื่องวัดความเป็นกรดด่างแบบตัวเลข (digital pH meter) รุ่น SP-SA ของบริษัท Suntex , Taiwan.

เครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer) รุ่น FD-1 ของบริษัท Eyela, Japan.

เครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N-1 ของบริษัท Tokyo Rikakikai , Japan.

เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (homogenizer) รุ่น AM-11 ของบริษัท Nihon seiki Kaisha , Japan.

เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.

เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น S 2000 B ของบริษัท Beckman, USA.

ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Hearson, England.

อ่างน้ำมันควบคุมอุณหภูมิ (oil bath) รุ่น O 270 ของบริษัท Memmert, West Germany.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1) <u>การแยกราที่สามารถฟอกสีน้ำกากส่าและผลิตโพลีแซคคาไรด์จากตัวอย่างดิน น้ำและอากาศจากแหล่งต่างๆ</u>

ทำการเก็บตัวอย่างดิน น้ำ น้ำกากส่า และอากาศจากโรงงานผลิตเอทานอลและแหล่งต่างๆในประเทศไทย ดังแสดงในตารางที่ 3 เพื่อนำมาแยกราด้วยวิธีการในข้อ 2

2) <u>การคัดแยกราโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง(solid medium)</u>

ชั่งตัวอย่างดินมา 1 กรัมหรือดูดตัวอย่างน้ำ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) นำไปเจือจางตามลำดับ แล้วดูดสารแขวนลอยในแต่ละความเข้มข้นมา 1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar) (ภาคผนวก ก) ด้วยแท่งแก้วงอให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้องจนสายใยราขึ้น แยกโคโลนีเดี่ยวมาทำให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงชนิดเดิม บ่มไว้จนเห็นสายใยราเจริญเต็มที่ ส่วนราจากอากาศใช้อาหารเลี้ยงเชื้อPDA ในจานเลี้ยงเชื้อนำไปวางไว้ในที่ที่มีอากาศถ่ายเทสะดวก เปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อไว้ประมาณ 15 นาที แล้วปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องจนสายใยราขึ้น แยกโคโลนีเดี่ยวมาทำให้บริสุทธิ์เช่นเดียวกันกับราที่แยกได้จากดินและน้ำ

3) <u>การคัดเลือกราที่มีความสามารถฟอกสีน้ำกากส่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง</u>

นำราที่แยกได้บริสุทธิ์จากข้อ 2 มาจุด (spot) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MPA (Molasses Pigment Agar) ตามสูตรของสันทัดและคณะ (22) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน แล้วนำมาตรวจสอบความสามารถในการฟอกสีน้ำกากส่า โดยสังเกตจากสีของอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณรอบๆโคโลนีซึ่งปรกติจะมีสีน้ำตาลดำ ถ้าราสายพันธุ์นั้นสามารถฟอกสีน้ำกากส่าได้สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะจางลง

ตารางที่ 3 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่าง ประเภทของตัวอย่าง และตัวอย่างที่เก็บ

แหล่งตัวอย่าง	ประเภทและจำนวนตัวอย่าง		
	ดิน	น้ำ	น้ำกากส่า
โรงงานสุราแสงโสม อ.สามพราน จ.นครปฐม	37	10	23
โรงงานสุรากรมสรรพสามิต จ.ฉะเชิงเทรา	21	3	3
โรงงานสุรากรมสรรพสามิต จ.อุตรดิตถ์	19	-	-
อ.เมือง จ.กาญจนบุรี	10	-	-
อ.เมือง จ.เชียงใหม่	10	-	-
อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	10	-	-
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน อ.เมือง จ.ชลบุรี	10	5	-
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพ	20	5	-
การปนเปื้อนจากอากาศ บริเวณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	-	-	-
รวม	108	23	26

รวมทั้งสิ้น 9 แหล่ง ได้ตัวอย่าง 158 ตัวอย่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4) การเก็บรักษาราที่มีความสามารถฟอกสีน้ำกากส่า

นำราสายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดเลือกมาจากข้อ 3 ที่มีความสามารถในการฟอกสีน้ำกากส่าไปจุดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แข็งเอียงในหลอดทดลองบ่มที่อุณหภูมิห้องจนสายใยราเจริญเต็มที่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

5) การคัดเลือกราที่มีความสามารถในการฟอกสีน้ำกากส่าและผลิตโพลีแซคคาไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (liquid medium)

นำราสายพันธุ์ต่างๆ ที่เก็บรักษาไว้ในข้อที่ 4 มาทำการทดสอบโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีสารละลายสีน้ำกากส่า MPM (Molasses Pigment Medium) ตามสูตรของสันทัดและคณะ (22) (ภาคผนวก ก) ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวย ตามวิธีการในข้อ 6 หลังจากมีการเจริญของราแล้วทำการแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง วัดการฟอกสีน้ำกากส่า การเจริญและการผลิตโพลีแซคคาไรด์ ตามวิธีการในข้อ 7,8 และ 9 ตามลำดับ

6) การเลี้ยงราในขวดแก้วทรงกรวย

เตรียมราเริ่มต้นในรูปของสายใยแขวนลอย (mycelium suspension) โดยเลี้ยงราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน ย้ายราดังกล่าวลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB (Potato Dextrose Broth) ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-14 วัน ราจะเจริญเติบโตเต็มผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำส่วนของสายใยมาปั่นละเอียดกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 20 มิลลิลิตรด้วยเครื่องปั่นละเอียด (homogenizer) จะได้สายใยแขวนลอย 20 มิลลิลิตร คิดเป็นปริมาณเชื้อ 0.2 กรัมน้ำหนักแห้งต่อ 1 มิลลิลิตร ย้ายสายใยแขวนลอยรา 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MPM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คิดเป็นปริมาณเชื้อ 0.2 กรัมน้ำหนักแห้งต่อ 1 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบไปกลับ (reciprocal shaker) อัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน

7) การวัดความสามารถในการฟอกสีน้ำกากส่า

เปอร์เซ็นต์การฟอกสีน้ำกากส่าตามวิธีการของ Ueda และคณะ (16) โดยแยกเซลล์ของราจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงราในข้อ 6 ด้วยเครื่องรีฟริเจเรเทดเซนตริฟิวจ์ (refrigerated centrifuge) ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อมาเจือจาง 10 เท่าด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข) ความเข้มของสีวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงจากเครื่องสเปคโทรโฟโตมิเตอร์(spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร คำนวณเปอร์เซ็นต์การฟอกสีตามสูตรในภาคผนวก ค.

8) การวัดการเจริญของรา

ชั่งน้ำหนักส่วนตะกอนของเซลล์ราที่ปั่นแยกได้จากข้อ 7 ในถ้วยสแตนเลสที่ชั่งน้ำหนักคงที่แล้ว อบแห้งในตู้อบแห้ง (hot air oven) อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาใส่ในโถดูดความชื้น(desiccator) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงจนน้ำหนักคงที่ แล้วชั่งด้วยเครื่องชั่งละเอียด คำนวณเป็นน้ำหนักแห้งของราต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร

9) การวัดการผลิตโพลีแซคคาไรด์ของรา

โพลีแซคคาไรด์ที่สร้างโดยรา สามารถแยกออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้วตามวิธีการในข้อ 8 โดยตกตะกอนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย 95 เปอร์เซนต์เอทานอล 20 มิลลิลิตร (2 เท่า) ตามวิธีการของ Ueda และคณะ(40) วัดค่าน้ำหนักแห้งของโพลีแซคคาไรด์ที่ตกตะกอนได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร ตามวิธีการวัดน้ำหนักแห้งในข้อ 8 ส่วนโพลีแซคคาไรด์ที่เหลือนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer) เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของโพลีแซคคาไรด์ต่อไป

10) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงราให้มีความสามารถในการฟอกสีน้ำกากส่าและผลิตโพลีแซคคาไรด์ในระดับขวดเขย่า

10.1) เปรียบเทียบรูปแบบของเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ

ทำการทดลองเปรียบเทียบรูปแบบของเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการทดลองระหว่างสปอร์และสายใยของราว่าแบบใดจะให้ผลในการฟอกสีน้ำกากส่าและผลิตโพลีแซคคาไรด์ได้ดีกว่า โดยใช้สปอร์ปริมาณ $1x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค) และใช้สายใยราปริมาณ 0.2 กรัมน้ำหนักแห้งต่อ 100 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค) ในแต่ละรูปแบบของเชื้อเริ่มต้นนั้นก็เลี้ยงด้วยเครื่องเขย่า 2 แบบคือ reciprocal และ rotary ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วันเช่นเดียวกัน

10.2) เปรียบเทียบลักษณะการให้อากาศในระดับขวดเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 2 แบบ

ทำการทดลองเปรียบเทียบลักษณะการให้อากาศในการเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องเขย่า 2 แบบคือ reciprocal และ rotary ในแต่ละชนิดของเครื่องเขย่าใช้ความเร็วในการเขย่า 4 ระดับคือ 50, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที และในแต่ละระดับความเร็วใช้ขวดเขย่าความจุ 2 ขนาด คือ 250 มิลลิลิตรและ 500 มิลลิลิตร เพื่อเปรียบเทียบว่าลักษณะการให้อากาศแบบใดเหมาะสมในการฟอกสีน้ำกากส่าและผลิตโพลีแซคคาไรด์ของราได้ดีที่สุด

10.3) การหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการฟอกสีน้ำกากส่าและผลิตโพลีแซคคาไรด์

ทำการทดลองเลี้ยงราในสภาวะการให้อากาศที่เหมาะสมจากข้อ 10.2 โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่แตกต่างกันดังนี้ คือ 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 และ 0.30 กรัมน้ำหนักแห้งต่อ 100 มิลลิลิตร เพื่อหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่น้อยที่สุดที่รามีความสามารถในการฟอกสีน้ำกากส่าและผลิตโพลีแซคคาไรด์

10.4) การหาความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ในการฟอกสีน้ำกากส่าและผลิตโพลีแซคคาไรด์

ทำการเลี้ยงราในสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อจากข้อ 10.3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MPM โดยทำการปรับความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในระดับต่างๆกันดังนี้คือ 3,4,5,6,7 และ 8 เพื่อหาความเป็นกรดด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดในการฟอกสีน้ำกากส่าและผลิตโพลีแซคคาไรด์

10.5) การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการฟอกสีน้ำกากส่าและผลิตโพลีแซคคาไรด์

ทำการเลี้ยงราในสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อจากข้อ 10.4 โดยทำการผันแปรอุณหภูมิในการบ่มเชื้อ 3 ระดับ คือ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการฟอกสีน้ำกากส่าและผลิตโพลีแซคคาไรด์

11) <u>ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการฟอกสีน้ำกากส่าและผลิตโพลีแซคคาไรด์</u>

11.1) การหาชนิดของแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสมในการฟอกสีน้ำกากส่าและผลิตโพลีแซคคาไรด์

ทำการเลี้ยงราด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MPM ที่มีการผันแปรชนิดของแหล่งอาหารคาร์บอน 2 ชนิดคือ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครส เพื่อหาชนิดของแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสมในการฟอกสีน้ำกากส่าและผลิตโพลีแซคคาไรด์

11.2) การหาความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสมในการฟอกสีน้ำกากส่าและผลิตโพลีแซคคาไรด์

ทำการเลี้ยงราด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MPM โดยใช้แหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสม จากข้อ 11.1 ทำการผันแปรความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์บอนที่ใช้ในระดับต่างๆกันดังนี้คือ 0,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 และ3.0 เปอร์เซนต์ตามลำดับ เพื่อหาความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสมในการฟอกสีน้ำกากส่าและผลิตโพลีแซคคาไรด์

11.3) การหาชนิดของแหล่งอาหารไนโตรเจนที่เหมาะสมในการฟอกสีน้ำกากส่าและผลิตโพลีแซคคาไรด์

ทำการเลี้ยงราด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MPM ที่ใช้แหล่งอาหารคาร์บอนและ

ความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์บอนดังในข้อ 11.2 แล้วทำการผันแปรชนิดของแหล่งอาหารไนโตรเจน 6 ชนิดคือ ยีตส์สกัด (yeast extract), เปปโตน (peptone), โพลีเปปโตน (polypeptone), โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$), แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_3)_2SO_4$] และยูเรีย(Urea) เพื่อหาชนิดของแหล่งอาหารไนโตรเจนที่เหมาะสมในการฟอกสีน้ำกากส่าและผลิตโพลีแซคคาไรด์

11.4) การหาปริมาณความเข้มข้นของแหล่งอาหารไนโตรเจนที่เหมาะสมในการฟอกสีน้ำกากส่าและผลิตโพลีแซคคาไรด์

ทำการเลี้ยงราด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MPM ที่ใช้แหล่งอาหารไนโตรเจนที่เหมาะสมดังในข้อ 11.3 ทำการผันแปรความเข้มข้นของแหล่งอาหารไนโตรเจนที่ใช้ในระดับต่างๆกันดังนี้คือ 0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5และ 0.6 เปอร์เซนต์ตามลำดับ เพื่อหาความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสมในการฟอกสีน้ำกากส่าและผลิตโพลีแซคคาไรด์

12) ศึกษาคุณสมบัติบางประการของโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากรา

ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของโพลีแซคคาไรด์

นำโพลีแซคคาไรด์ที่ได้มาทำการไฮโดรไลซ์อย่างสมบูรณ์ (complete hydrolysis) ตามวิธีการของ Trevelyan และคณะ (46) โดยการชั่งตัวอย่างโพลีแซคคาไรด์ประมาณ 5-10 มิลลิกรัม ละลายด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2 นอร์มอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในขวดแก้วขนาดเล็กให้สมบูรณ์ ปล่อยแก๊สไนโตรเจนลงไปในขวดแก้วดังกล่าวเป็นเวลา 30 วินาทีปิดโดยเร็วด้วยเทปกาวชนิดพันสายไฟฟ้าให้แน่น แช่ขวดแก้วลงในอ่างน้ำมัน (oil bath) อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมงระหว่างนี้ห้ามเปิดฝาขวดเด็ดขาด หลังจากนั้นนำมาวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วถ่ายของในขวดแก้วลงในหลอดสำหรับปั่นแยก (centrifuge tube)ขนาดเล็ก ล้างขวดดังกล่าวด้วยน้ำกลั่นปริมาณน้อยมาก (0.05-0.1 มิลลิลิตร) 2 ครั้งแล้วเทของเหลวรวมในหลอดปั่นแยกนั้น ทำสารในหลอดปั่นแยกให้เป็นกลาง (neutralized) ด้วยแบเรียมคาร์บอเนต ($BaCO_3$) โดยค่อยๆใส่ทีละน้อย สังเกตดูฟองแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์(CO_2) ที่เกิดขึ้น ใส่จนไม่มีฟองแก๊สเกิดขึ้น (เพื่อให้แน่ใจควรทิ้งไว้สักพัก) และวัดความเป็นกรดด่างให้ได้

เท่ากับ 7 ด้วยกระดาษวัดความเป็นกรดด่าง (pH paper) ซึ่งจะเห็นตะกอนสีขาวของแบเรี่ยมซัลเฟต ($BaSO_4$) จากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนออกด้วยเครื่องปั่นแยก (centrifuge) ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสมาใส่ในหลอดแก้วขนาดเล็กที่สะอาดแล้วนำไประเหยในตู้อบอุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียสจนปริมาตรเหลือน้อยสุด

ตรวจสอบชนิดของน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการไฮโดรไลซ์โพลีแซคคาไรด์อย่างสมบูรณ์ ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีกระดาษ (paper chromatography) แบบ ascendingโดยการนำโพลีแซคคาไรด์ที่ไฮโดรไลซ์อย่างสมบูรณ์แล้วมาจุด(spot) ลงบนกระดาษกรอง Whatman No.1 เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลฟรุตโตส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกาแลคโตส และน้ำตาลแลคโตส ความเข้มข้น 1มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตัวอย่างละ 5 ไมโครลิตร ในภาชนะที่อิ่มตัวไปด้วยไอของสารละลายผสมของบิวทานอล ต่อ ไพริดีน ต่อ น้ำ (n-butanol:pyridine:water)ในอัตราส่วน 6:4:3 (โดยปริมาตร) เมื่อสารละลายซึมถึงตำแหน่งขอบบนมากที่สุดนำมาทำให้แห้ง แล้วทำให้เกิดสีโดยวิธีอัลคาไลซิลเวอร์ไนเตรท (46) (ภาคผนวก ข)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย