ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำหมัก

1. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl method (A.O.A.C., 1990)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4)
2. สารช่วยเร่งการย่อย (catalyst) ประกอบด้วย $CuSO_4$ 1 ส่วน และ K_2SO_4 10 ส่วน
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้นร้อยละ 40
4. กรดบอริก (H_3BO_3) เข้มข้นร้อยละ 40
5. mixed indicator
   5.1 ชั่ง 0.125 กรัม เมทิลเรด และ 0.082 กรัม เมทิลีนบลูละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
   5.2 ชั่ง 0.1 กรัม โปรโมครีซอลารีนละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
   5.3ผสมสารละลายข้อ 1 และข้อ 2 ในอัตราส่วนสารข้อ 1 ต่อสารข้อ 2 เท่ากับ 5 ต่อ

วิธีการ

1. ดูดตัวอย่าง 5 – 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดย่อยตามปริมาณไนโตรเจนที่คาดว่าจะมี ถ้ามีมากก็ใช้น้อย ถ้ามีน้อยก็ใช้มาก (ทำ blank ทุกครั้ง)
2. ใส่สารช่วยเร่งการย่อย (Catalyst) 1-2 กรัม
3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5-10 มิลลิลิตร สวมและเปิดเครื่องดักจับไอกรด
4. ย่อยที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นจนถึง 350 องศาเซลเซียส จะใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง
5. เมื่อย่อยจนใสหรือได้สารละลายสีฟ้าหรือเขียวอมฟ้า ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
6. นำไปกลั่น

การกลั่นตัวอย่าง

1. ใส่ตัวอย่างในหลอดกลั่น เติมน้ำประมาณ 60-100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เพื่อผสมกรด
2. ใส่หลอดเข้ากับเครื่องกลั่นที่พร้อมจะกลั่นเปิดน้ำหล่อเย็น อัตราการไหล 3-4 ลิตรต่อนาที
3. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 ลงไปช้าๆ จนได้สารละลายสีดำ
4. เริ่มกลั่นโดยใช้กรดบอริก (2%) ที่มีการเติม mixed indicator ประมาณ 2-3 หยด
5. กลั่นให้ได้ condensate ประมาณ 100-150 มิลลิลิตร ก่อนเสร็จการกลั่นในแต่ละครั้งให้เลื่อนฟลาสก์เก็บตัวอย่างลงให้พ้นของเหลว กลั่นต่อประมาณ 1 นาที เพื่อล้างเครื่องกลั่น
6. ไตเตรทกับ 0.02-0.1 นอร์มอล HCl หรือ H_2SO_4 หักค่า blank ออกเพื่อนำไปคำนวณ

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ร้อยละ)} = \frac{(A - B) \times N \times 14}{W}$$

A คือ ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเทรตตัวอย่าง

B คือ ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเทรต blank

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก

2. การวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตในน้ำ : Ascorbic Acid Method (APHA, AWWA and WPCF, 1985 : 448-450)

สารเคมี

1. สารละลายกรดกำมะถัน 5 นอร์มัล

เตรียมโดยเติมกรดกำมะถันเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) 70 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร

2. สารละลายแอนติโมนีโพแตสเซียมทาเทรท

เตรียมโดยละลายแอนติโมนีโพแตสเซียมทาเทรท ($K(SbO)C_4H_4O_6.1/2H_2O$) 1.3715 กรัม ในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดแก้ว

3. สาราละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท

เตรียมโดยละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ 20 กรัม ในน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดพลาสติกที่ 4 องศาเซลเซียส

4. สารละลายกรดแอสคอร์บิค 0.1 โมลาร์

เตรียมโดยละลายกรดแอสคอร์บิค 1.76 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ซึ่งสารจะอยู่ตัว 1 อาทิตย์ ถ้าเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

5. น้ำยารวม (Combined reagent) 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- 50 มิลลิลิตร 5 นอร์มอล กรดกำมะถัน
- 5 มิลลิลิตร สารละลายแอนติโมนีโพแทสเซียมทาเตรท
- 15 มิลลิลิตร สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท
- 30 มิลลิลิตร สารละลายกรดแอสคอร์บิค

น้ำยาเคมีเหล่านี้ผสมกันที่อุณหภูมิห้อง ถ้ามีความขุ่นเกิดขึ้นหลังจากการเติมแอนติโมนีโพแทสเซียมทาเตรท หรือแอมโมเนียมโมลิบเดท ให้เขย่าแล้วทิ้งไว้ประมาณ 2-3 นาที น้ำยารวมจะอยู่ตัว 4 ชั่วโมง

6. สารละลายสต็อคฟอสเฟต

เตรียมโดยนำโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต KH_2PO_4 anhydrous 219.5 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร 1 มิลลิลิตรของสารละลายเท่ากับ 50 ไมโครกรัม PO_4-P

7. สารละลายมาตรฐานฟอสเฟต

เตรียมโดยนำสารละลายสต็อคฟอสเฟต 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ 1000 มิลลิลิตร ซึ่ง 1 มิลลิลิตรของสารละลายเท่ากับ 2.5 ไมโครกรัม PO_4-P

วิธีการ

1. เตรียมกราฟมาตรฐานของฟอสเฟตเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5, 0.8 และ 1.2 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอสเฟต 2, 6, 10, 16 และ 24 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดที่กำหนด เขย่าให้เข้ากันแล้วเทสารละลายใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมฟีนอล์ฟทาลีนอิน-ดิเคเตอร์ 1 หยด ถ้าเกิดสีแดงให้หยด 5 นอร์มอล H_2SO_4 ลงไปจนกระทั่งสีแดงหายไป เติมน้ำยารวม (Combine reagent) 8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10-30 นาที เพื่อให้เกิดสี นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 880 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟอสเฟตและค่าการดูดกลืนแสง
2. วิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสม 50 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ตามวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของฟอสเฟต
3. การคำนวน

mg/lP = (mgP x 1000)/(มิลลิลิตร Sample)

mg/lPO_4 = mg/lP x 3.06

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธี Somogyi-Nelson method (Nelson, 1944)

สารเคมี

1. สารละลายคอปเปอร์ (Copper reagent)

เตรียมโดยละลาย Sodium Potassium Tartate 12 กรัม Na_2CO_3 anhydrous 24 กรัม $NaHCO_3$ 16 กรัม และ Na_2SO_4 (anhydrous) 144 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และ เติมสารละลายที่มี $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 4 กรัม และ Na_2SO_4 36 กรัม (ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ก่อน) ผสมให้เข้ากัน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1-2 วันก่อนนำไปใช้ กรอง (หากมีตะกอน) และเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

2. สารละลายเนลสัน (Nelson reagent) เตรียมโดย

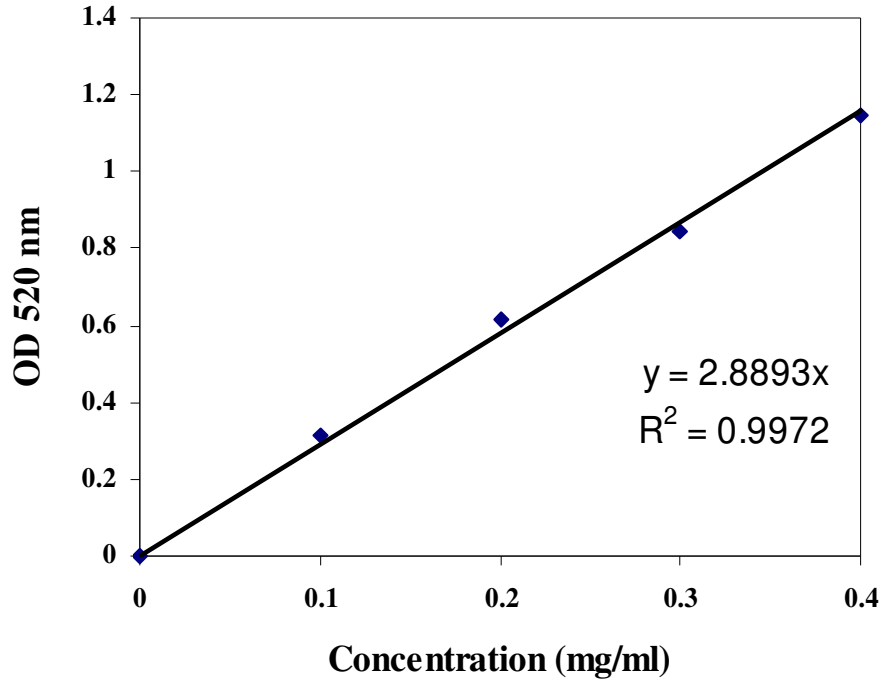
ละลาย $(NH_4)MoO_4 \cdot 4H_2O$ 50 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตรเติมกรดกำมะถันเข้มข้น 42 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เติม $Na_2Has_2O_4 \cdot 7H_2O$ 3 กรัม ที่ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1-2 วันที่อุณหภูมิ 37 °ซ กรอง (หากมีตะกอน) และเก็บในขวดสีชา

วิธีการ

1. เตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น โดยบรรจุสารละลายมาตรฐานในหลอดทดสอบหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายคอปเปอร์ 0.5 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 10 นาที ทำให้เย็นทันที เติมสารละลายเนลสัน 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสง
2. วิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ตามวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

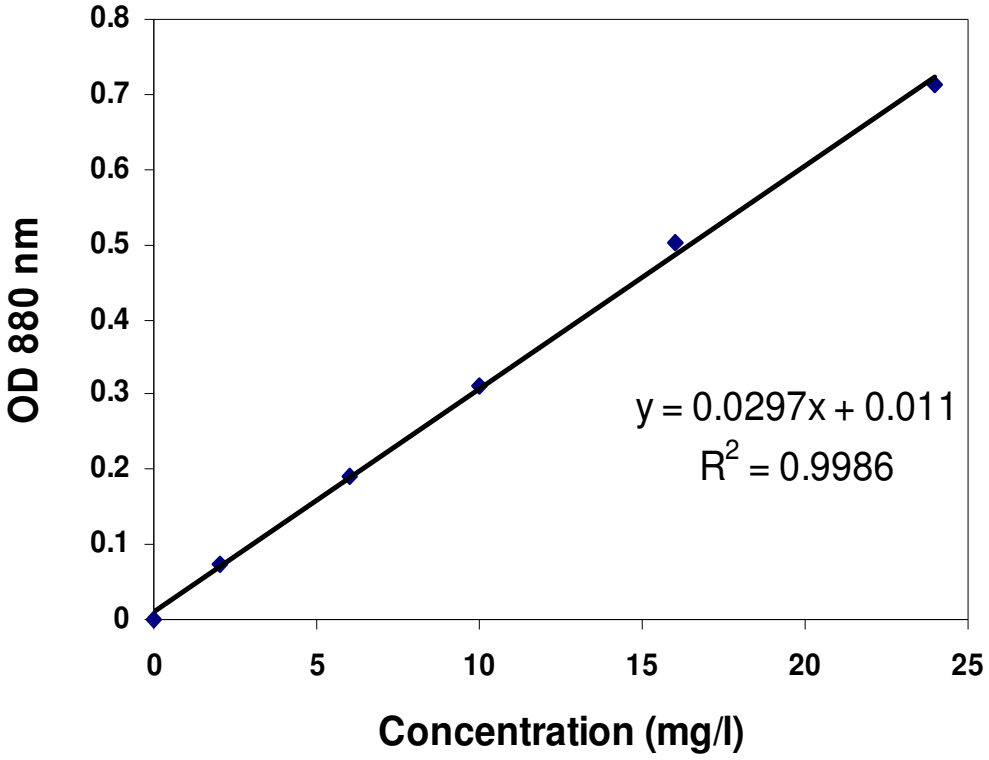
ภาคผนวก ข

เส้นกราฟมาตรฐานต่างๆ



ภาพที่ 29 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

Figure 29. Standard curve for reducing sugar analyze.



ภาพที่ 30 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณฟอสเฟต

Figure 30. Standard curve for phosphate analyze.

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ตารางที่ 13 ค่าความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองของแบบหุ่นต่อการเจริญของจุลินทรีย์

Table 13. ANOVA for response surface quadratic model on cell growth.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	7.07	14	0.51	4.89	0.0021
Residual	1.55	15	0.10		
Lack of Fit	1.23	10	0.12	1.92	0.2445
Pure Error	0.32	5	0.064		
Cor Total	8.62	29			

Root MSE	0.32	R-Squared	0.8204
Dep Mean	1.70	Adj R-Squared	0.6527
C.V.	18.92	Pred R-Squared	0.1258
PRESS	7.54	Adeq Precision	9.822

ตารางที่ 14 ค่าความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองของแบบหุ่นต่อการผลิต PHA

Table 14. ANOVA for response surface quadratic model on PHA production.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	0.43	14	0.031	2.98	0.0220
Residual	0.16	15	0.010		
Lack of Fit	0.13	10	0.013	2.22	0.1955
Pure Error	0.029	5	5.706E-03		
Cor Total	0.59	29			

Root MSE	0.10	R-Squared	0.7357
Dep Mean	0.64	Adj R-Squared	0.4890
C.V.	16.00	Pred R-Squared	-0.3127
PRESS	0.77	Adeq Precision	6.021

ตารางที่ 15 ค่าความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองของแบบหุ่นต่อการเก็บสะสม PHA

Table 15. ANOVA for response surface quadratic model on PHA accumulation.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	2268.26	14	162.02	7.15	0.0003
Residual	339.75	15	22.65		
Lack of Fit	227.33	10	22.73	1.01	0.5294
Pure Error	112.42	5	22.48		
Cor Total	2608.01	29			

Root MSE	4.76	R-Squared	0.8697
Dep Mean	39.56	Adj R-Squared	0.7481
C.V.	12.03	Pred R-Squared	0.4358
PRESS	1471.33	Adeq Precision	12.069