บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์

1. บัฟเฟิลฟลาสก์ (Buffled Flask) ขนาด 500 และ 250 มิลลิลิตร

2. ถังหมัก (Fermenter) รุ่น Biostat B บริษัท B. Braun Biotech International ประเทศเยอรมณี ปริมาตรบรรจุ 5 ลิตร มีใบกวนแบบ Disc Rushton Turbine เส้นผ่านศูนย์กลาง 7.5 เซนติเมตร จำนวน 6 ใบ

3. ฟลาสก์ต่อแขน (Side Down Buffle Flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร

4. ขวดฝาเกลียว ขนาด 5 ลิตร

5. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker) รุ่น C25 KC Classic Incubator Shaker บริษัท New Brunswick Sciencetific ประเทศสหรัฐอเมริกา

6. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH Meter) รุ่น Basic บริษัท Denver Instrument ประเทศสหรัฐอเมริกา

7. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น WEST 4100+ บริษัท Astoll Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

8. ตู้แช่เย็น (Freezer) รุ่น Sanyo SF 492 บริษัท Sanyo Gallenkamp PLC ประเทศอังกฤษ

9. ตู้เขี่ยเชื้อ

10. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Micro Centrifuge) รุ่น Micro Centrifuge (MSE) บริษัท Sanyo ประเทศญี่ปุ่น

11. เครื่องชั่ง 4 และ 2 ตำแหน่ง (Digital Balance) รุ่น Sartorious cp 224S บริษัท Sartorious Machanics ประเทศเยอรมนี

12. ตู้อบความร้อน (Oven) รุ่น Memmert model 500 บริษัท Memmert GmBH & Co. ประเทศเยอรมนี

13. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer) รุ่น GVC Cinta 40 บริษัท GBC Sciencetific Equipment ประเทศออสเตรเลีย

14. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) รุ่น Julabo TW20 บริษัท Julabo ประเทศสหรัฐอเมริกา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

15. ปีเปต (Auto Pipette) ขนาด 200 ไมโครลิตร 1000 ไมโครลิตร และ 10 มิลลิลิตร

16. หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge Tube) ขนาดบรรจุ 1.5 15 และ 50 มิลลิลิตร

17. หลอดทดลอง (Test Tube) ขนาดบรรจุ 15 มิลลิลิตร

18. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50 100 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร

19. ขวดเก็บตัวอย่าง ปริมาตร 10 และ 50 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. สารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก)

2. สารละลายเดกซ์ทรินที่ได้จากการย่อยสบายแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก)

3. ผงยีสต์สกัด (Yeast Extract)

4. เปปโตน (Peptone)

5. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)

6. โพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2HPO_4)

7. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_20$)

8. กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)

9. สารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 นอร์มอล (4N NaOH) (ภาคผนวก ก)

10. สารละลายกรดไฮโดรคลอริค 2 นอร์มอล (2N HCl) (ภาคผนวก ก)

11. โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทต ($KNaC_4H_4O_6$)

12. กรดไดไนโตรซาลิซาลิก (Dinitrosalisalic acid : DNS)

13. สารละลายฟีนอล (C_6H_5OH)

14. เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (GC 358) บริษัท สยามวิกตอรี, ประเทศไทย

15. เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (GC 147) บริษัท สยามวิกตอรี, ประเทศไทย สำหรับกระบวนการผลิตกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

16. เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Optimat 140) บริษัท สยามวิกตอรี, ประเทศไทย สำหรับการเพาะเลี้ยง *S.cerevisiae*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สูตรอาหาร (ภาคผนวก ก)

1. สูตรอาหาร BPM (Batch Production Medium) นำมาใช้เป็นอาหารในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบทั้ง 2 ชนิด

2. สูตรอาหาร NB ใช้เป็น Inoculums Medium และอาหารมาตรฐาน สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli*

3. สูตรอาหาร YPD ใช้เป็น Inoculums Medium และอาหารมาตรฐาน สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. cerevisiae*

จุลินทรีย์ที่ใช้และสภาวะการเพาะเลี้ยง

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ มี 2 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความนิยมนำมาใช้และรู้จักกันอย่างแพร่หลาย ของแต่ละชนิด ซึ่งได้แก่

1. *E. coli* DH1/ ATCC 33849 สภาวะที่เหมาสมในการเพาะเลี้ยงคือ ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง นาน 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง

2. *S. cerevisiae* S3 จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงคือ ค่าพีเอชเท่ากับ 4.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมหัวเชื้อ

การเตรียมหัวเชื้อของจุลินทรีย์ต้นแบบในการทดลองครั้งนี้ มีวิธีการดังต่อไปนี้

1.1 ถ่ายหัวเชื้อจุลินทรีย์ต้นแบบทั้งสองชนิด ที่เก็บรักษาในหลอดวุ้นเอียงของอาหารมาตรฐานเฉพาะของจุลินทรีย์ต้นแบบแต่ละชนิด ประมาณ 2-3 โคโลนี ลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในบัฟเฟิลฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

1.2 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ตามอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ต้นแบบ (ตามหัวข้อจุลินทรีย์ที่ใช้และสภาวะการเพาะเลี้ยง) ด้วยอัตราการเขย่า 180 รอบต่อนาที

1.3 น้ำหมักที่ได้ จะใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นของการทดลองต่อไปทั้งหมด โดยใช้ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยง (Production Medium)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. การศึกษาประสิทธิภาพสูตรอาหาร BPM ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบ

เปรียบเทียบความสามารถในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต้นแบบระหว่างการเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงสูตร BPM กับ สูตรอาหารมาตรฐานของจุลินทรีย์ต้นแบบแต่ละชนิด

2.1 เตรียมอาหารสูตร BPM (ตามภาคผนวก ก) ที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และสูตรอาหารมาตรฐานของจุลินทรีย์ต้นแบบแต่ละชนิด (NB และ YPD ตามหัวข้อสูตรอาหาร ซึ่งมีวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก) จากนั้นนำไปปรับค่าพีเอชให้เหมาะสมตามสภาวะการเพาะเลี้ยงของจุลินทรีย์ต้นแบบแต่ละชนิด ใส่ลงในบัฟเฟิลฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร บรรจุอาหารฟลาสก์ละ 95 มิลลิลิตร เตรียมอย่างละ 3 ฟลาสก์ จากนั้นนำไปผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.2 ถ่ายหัวเชื้อจุลินทรีย์ต้นแบบที่ทำการเตรียมไว้ล่วงหน้าแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ที่บรรจุอาหาร

2.3 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อัตราการเขย่า 180 รอบต่อนาที ตามอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ต้นแบบ (ตามหัวข้อจุลินทรีย์ที่ใช้และการเพาะเลี้ยง)

2.4 เก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อครั้ง (ตามระยะเวลาการเก็บตัวอย่างที่บอกไว้ในสภาวะการเพาะเลี้ยงข้างต้น) ใส่ลงในขวดฝาเกลียว แช่เย็นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ได้แก่ ค่าความขุ่น ปริมาณน้ำตาลคงเหลือ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักเซลล์แห้ง พร้อมทั้งบันทึกผลการทดลอง

3. การศึกษาประสิทธิภาพของเดกซ์ทรินในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบ

เปรียบเทียบความสามารถการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต้นแบบ ในการเพาะเลี้ยงโดยใช้กลูโคส และเดกทรินซ์ ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหาร BPM โดย

3.1 เตรียมอาหารสูตร BPM (ตามภาคผนวก ก) โดยแทนที่แหล่งคาร์บอน ในสูตรอาหารด้วย กลูโคส และเดกทรินซ์ ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปปรับค่าพีเอชให้เหมาะสมตามสภาวะการเพาะเลี้ยงของจุลินทรีย์ต้นแบบแต่ละชนิด ใส่ลงในบัฟเฟิลฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร บรรจุอาหารฟลาสก์ละ 95 มิลลิลิตร เตรียมอย่างละ 3 ฟลาสก์ จากนั้นนำไปผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.2 ถ่ายหัวเชื้อจุลินทรีย์ต้นแบบ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร BPM

3.3 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อัตราการเขย่า 180 รอบต่อนาที ตามอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ต้นแบบ (ตามหัวข้อจุลินทรีย์ที่ใช้และการเพาะเลี้ยง)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.4 เก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อครั้ง (ตามระยะเวลาการเก็บตัวอย่างที่บอกไว้ในสภาวะการเพาะเลี้ยงข้างต้น) ใส่ลงในขวดฝาเกลียว แช่เย็นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ได้แก่ ค่าความขุ่น ปริมาณน้ำตาลคงเหลือ และน้ำหนักเซลล์แห้ง พร้อมทั้งบันทึกผลการทดลอง

4. การศึกษาการใช้เดกซ์ทรินความเข้มข้นสูง ที่ระดับต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบ

4.1 เตรียมอาหารสูตร BPM (ตามภาคผนวก ก) ที่แทนที่แหล่งคาร์บอนด้วยเดกซ์ทริน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 20 60 และ 100 กรัมต่อลิตร โดยแยกส่วนของเดกซ์ทรินออก เทลงในถังหมัก ปริมาตรบรรจุ 5 ลิตร (ปริมาตรการทำงานรวมทั้งหมด 3,000 มิลลิลิตร)

4.2 ทำการปรับเทียบ (Calibration) อุปกรณ์วัดค่าพีเอช และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ พร้อมตั้งค่าสภาวะการทำงานต่าง ๆ ของถังหมักตามสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ต้นแบบที่จะทำการเพาะเลี้ยง

4.3 จากนั้นนำถังหมักที่บรรจุอาหารฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ส่วน เดกซ์ทรินที่แยกออกมา ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4.4 ติดตั้งและตั้งค่าอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้เข้าที่อีกครั้ง ปรับตั้งค่าปริมาณการเติมอากาศ และความเร็วของใบพัดในการกวน ตามระดับความเข้มเดกซ์ทรินที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ได้แก่

4.4.1 การเพาะเลี้ยงโดยใช้เดกซ์ทรินระดับความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ให้อัตราการเติมอากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ความเร็วใบพัด 500 รอบต่อนาที

4.4.2 การเพาะเลี้ยงโดยใช้เดกซ์ทรินระดับความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ให้อัตราการเติมอากาศ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ความเร็วใบพัด 600 รอบต่อนาที

4.4.3 การเพาะเลี้ยงโดยใช้เดกซ์ทรินระดับความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ให้อัตราการเติมอากาศ 3 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ความเร็วใบพัด 700 รอบต่อนาที

4.5 เติมเดกซ์ทรินที่แยกฆ่าเชื้อลงในถังหมัก ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้อาหารผสมเข้ากัน

4.6 เติมหัวเชื้อที่ได้จากการเตรียมตามวิธีการที่กล่าวข้างต้น ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยงลงในถัง (ปริมาตร 150 มิลลิลิตร)

4.7 เก็บตัวอย่างตามระยะเวลาการเก็บตัวอย่างที่บอกไว้ในสภาวะการเพาะเลี้ยงข้างต้น ใส่ลงในขวดฝาเกลียว แช่เย็นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ได้แก่ ค่าความขุ่น ปริมาณน้ำตาลกลูโคสคงเหลือ ปริมาณน้ำตาลคงเหลือทั้งหมด และน้ำหนักเซลล์แห้ง พร้อมทั้งบันทึกผลการทดลอง

5. การศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ- ต่อเนื่อง ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ทำการเตรียมสูตรอาหาร BPM ตามความเข้มข้นที่ให้ผลในการผลิตมวลเซลล์ของจุลินทรีย์ต้นแบบแต่ละชนิดได้ดีที่สุด จากการศึกษา หัวข้อ 4 และดำเนินการเพาะเลี้ยงตามขั้นตอนเดียวกัน เพื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบกะครั้งที่ 1 ตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิด จากนั้นทำการถ่ายน้ำหมักออก เหลือไว้เพียง 150 มิลลิลิตร (คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตรของ 3 ลิตร) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงแบบกะครั้งต่อไป จากนั้นเติมอาหารชุดใหม่ที่ส่วนประกอบและความเข้มข้นเท่าเดิม ปริมาตร 2,850 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงตามปกติ เมื่อครบตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่กำหนดจึงทำซ้ำอีก 1 ครั้ง (รวมทั้งสิ้น 3 ครั้ง) เพื่อเป็นการศึกษาว่าสามารถให้ผลผลิตของเซลล์ความเข้มข้นสูงได้หรือไม่และในการต่อเชื้อแต่ละครั้งให้ความแตกต่างกันหรือไม่

6. การเก็บตัวอย่างและ วิเคราะห์ผลการทดลอง

6.1 การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์ต้นแบบจะมีระยะเวลาการเก็บที่แตกต่างกันออกไป ตามความเหมาะสม โดย *E. coli* เก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 ชั่วโมง *S. cerevisiae* เก็บทุก ๆ 6 ชั่วโมง โดยในการเก็บตัวอย่างสำหรับการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ ทำการเก็บครั้งละ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดฝาเกลียวจำนวน 3 ขวด ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในถังหมักนั้นทำการเก็บตัวอย่างครั้งละ 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วฝาเกลียว จำนวน 3 หลอด จากนั้น นำไปแช่น้ำแข็งนาน 5 นาที และแช่แข็งที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส ต่อไปเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ผลการทดลอง

6.2 การวัดความขุ่น (Optical Density)

นำตัวอย่างน้ำหมัก (ในกรณีที่ความเข้มข้นมากเกินไป ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีความเข้มข้นที่เหมาะสม คือให้มีค่าความขุ่นอยู่ในช่วง 0.1-0.8) ใส่ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน จากนั้นวัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นำมาคำนวณเป็นค่าความขุ่นที่แท้จริง ดังนี้

ค่าความขุ่น = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร x อัตราการเจือจาง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

6.3 วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry Cell Weigh Analysis)

นำตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1 มิลลิลิตร ที่ผ่านการอบแห้งและชั่งน้ำหนักไว้แล้ว (ค่าน้ำหนักหลอดเปล่า) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อัตรา 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใส (Supernatant) ทิ้ง ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น (อุ่น) 2 ครั้ง แล้วนำเซลล์ที่ตกตะกอนไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก ซึ่งจะได้เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งรวมกับน้ำหนักของหลอด ดังนั้นจึงสามารถหาเฉพาะน้ำหนักเซลล์แห้งได้ โดยคำนวณตามสูตร ดังนี้

น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) = [[น้ำหนักเซลล์ (กรัม) +น้ำหนักหลอด (กรัม)] – น้ำหนักหลอด (กรัม)] x 1000

6.4 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลคงเหลือ (Reducing Sugar Analysis)

<u>การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส</u>

นำสารละลายมาตรฐานน้ำตาลคงเหลือ ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เจือจางใส่ในหลอดทดลองด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, และ 1.0 กรัมต่อลิตรในปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำเย็นต่ออีก 5 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดด้วยแผ่นพาราฟิน เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้พลอตกราฟเทียบกับความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานกับค่า OD ที่วัดได้ จากนั้นหาความชันของกราฟ และค่าความเบี่ยงเบนของกราฟ

<u>การวัดตัวอย่างน้ำตาลคงเหลือ</u>

นำตัวอย่างน้ำหมักที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนแล้ว มาทำการเจือจางให้เหมาะสม จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DNS (การเตรียมสารละลาย DNS ดูจากภาคผนวก) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำเย็นต่ออีก 5 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดด้วยแผ่นพาราฟิน เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเป็นปริมาณน้ำตาลคงเหลือโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส จากสูตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปริมาณน้ำตาลคงเหลือ(มก. / มล.) = (ค่าการดูดกลืนแสง x อัตราการเจือจาง)
ความชันของกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

6.5 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ดัดแปลงจาก ฉวีวรรณ สว่างวัน, 2548)

6.5. เตรียมตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใส่ลงปั่นเหวี่ยงขนาด 16 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที

6.5.2 นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงถ่ายลงหลอดทดลองขนาด 25 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นเติมกรดซัลฟูริค 97 เปอร์เซ็นต์ให้มีความเข้มข้นของกรดเหลือเพียง 0.5 เปอร์เซ็นต์

6.5.3 นำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

6.5.4 ปรับให้มีค่าพีเอชเป็นกลาง (pH 7.0) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 นอร์มอล

6.5.5 ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนซ้ำอีกครั้งเพื่อนำตะกอนต่าง ๆ ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาในการย่อยสลายออก

6.5.6 เก็บเฉพาะส่วนใสเพื่อนำมาทำการวัดปริมาณน้ำตาล ด้วยวิธี DNS (ข้อ 6.4)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University