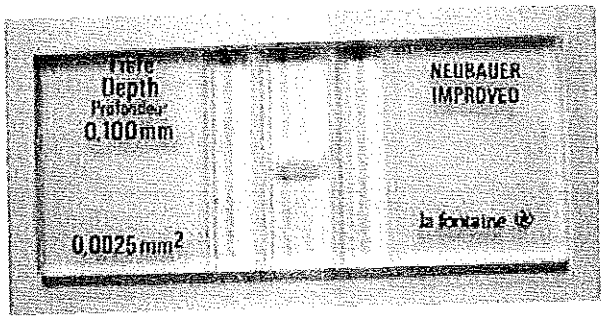
ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์

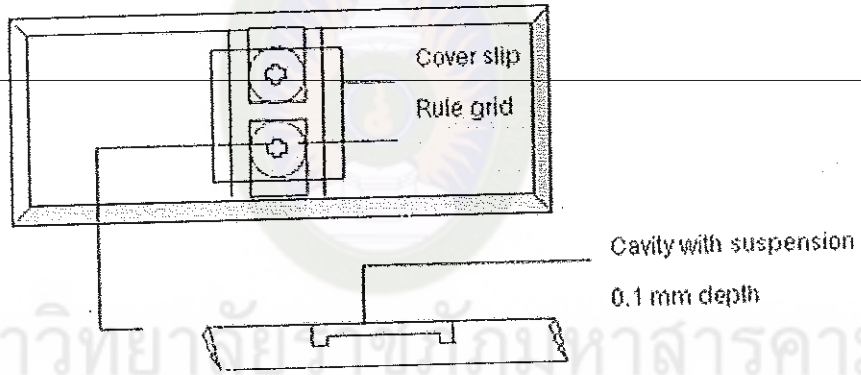
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

1. การคำนวณหาความเข้มข้นโดยใช้ Haemacytometer



ภาพผนวกที่ 1 แสดงลักษณะและขนาด (เท่าจริง) ของ Haemacytometer

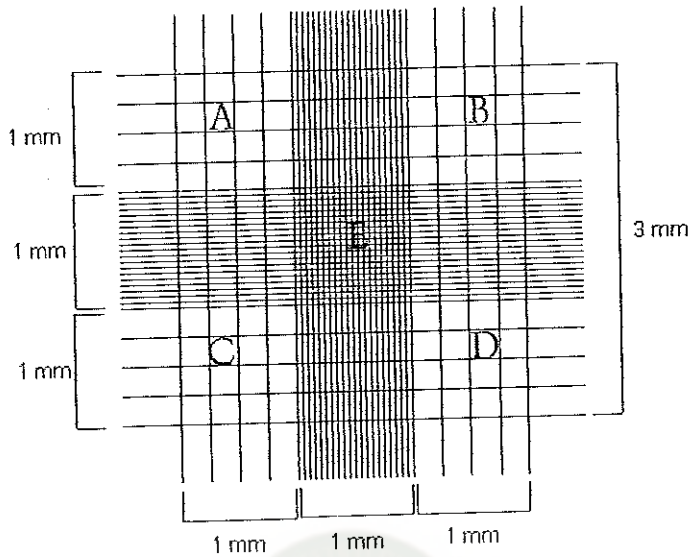
(ที่มา : http://web.agri.cmu.ac.th/ppath/course/360301/lesson5_inoculation_prepare)



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพผนวกที่ 2 แสดงลักษณะ และตำแหน่ง สำหรับการตรวจนับจำนวนตัวอย่าง เช่น สปอร์ของเชื้อรา ด้วย Haemacytometer

(ที่มา : http://web.agri.cmu.ac.th/ppath/course/360301/lesson5_inoculation_prepare)



ภาพผนวกที่ 3 แสดงบริเวณที่ใช้นับจำนวน A, B, C D และ E (Counting areas) ตัวอย่างที่ต้องการคำนวนหาความเข้มข้น

(ที่มา : http://web.agri.cmu.ac.th/ppath/course/360301/lesson5_inoculation_prepare)

การคำนวณหาความเข้มข้นโดยใช้ Haemacytometer

1. ในกรณีที่สปอร์หรือเซลล์ที่ต้องการนับมีขนาดเล็ก การนับควรใช้บริเวณ E ตรงกลาง ซึ่งประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก (Small squares) ทั้งหมด 25 ช่อง และแต่ละช่องเล็กนั้นจะประกอบด้วยช่องขนาดเล็กที่สุด (Smallest squares) อยู่ 16 ช่อง การนับสปอร์จำนับจำนวนทั้งหมดที่อยู่ในบริเวณนี้ รวมทั้งสปอร์ที่อยู่บริเวณขอบของตารางทุกช่องด้วย

2. พื้นที่บริเวณ E เท่ากับ 25 x 16 x 1/400 ตารางมิลลิเมตร

3. หากคิดเป็นปริมาตร (มีความลึก 1/10 มิลลิเมตร) จะเท่ากับ 25 x 16 x 1/400 x 1/10 ลูกบาศก์มิลลิเมตร หรือ 0.1 ลบ . มม

4. สมมุตินับสปอร์ในบริเวณ E ได้รวมทั้งหมดเท่ากับ Y สปอร์ ใน 0.1 ลบ . มม

5. ต้องการเทียบความเข้มข้นในหน่วย 1 ลบ . ซม หรือ 1 มล . ซึ่ง 1 มล . เท่ากับ 1000 ลบ . มม

ดังนั้น ในปริมาตร 0.1 ลบ . มม นับสปอร์ได้ = Y สปอร์

ถ้าใน 1000 ลบ . มม (1 มล .) จะมีสปอร์ = Y x 1000 x 1/0.1 สปอร์

= Y x 1 x 10^4 สปอร์ / มล .

6. ในกรณีสปอร์ หรือ เซลล์มีขนาดใหญ่ ควรนับจำนวนสปอร์หรือเซลล์ทุกบริเวณ A B C D และ E จากนั้นนำค่าที่ได้มารวมกัน และหาค่าเฉลี่ยโดยหารด้วย 5 อีกครั้ง ก่อนนำไปคำนวณความเข้มข้น เช่น สมมุตินับจำนวนสปอร์ได้รวมกันเท่ากับ Z สปอร์ ดังนั้นความเข้มข้นของสปอร์ต่อ 1 มล . = Z/5 x 1 x 10^4 สปอร์ / มล

7. การตรวจนับความเข้มข้นจะให้ผลใกล้เคียงมากที่สุด จะต้องทำให้ Suspension กระจายตัวมากที่สุด หรืออาจจำเป็นจะต้องมีการนับมากครั้งขึ้น เช่น 5-10 ครั้ง แล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ยภายหลัง หรือบางครั้งอาจจำเป็นต้องเติม Wetting agent เช่น Tween 20 ลงไปเพื่อช่วยให้สปอร์ หรือ เซลล์ กระจายตัวได้ดีขึ้น (ทั้งนี้เพื่อให้การคำนวณความเข้มข้นถูกต้องแม่นยำมากขึ้น) จากนั้นจึงใช้ Dropper หรือ Loop หยด Suspension ของเชื้อลงบน Scale ของ Haemacytometer ข้างละ 1 หยด จากนั้นใช้ Cover slip ปิดทับ กดเบา ๆ หากใส่หยดของ Spore suspension พอดีจะไม่มีเชื้อเหลือล้นออกมาจากสไลด์

8. นำสไลด์ที่เตรียมได้ไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทัศน์ นับจำนวนสปอร์ หรือเซลล์ของเชื้อ แล้วนำไปคำนวณหาความเข้มข้นโดยวิธีคำนวณข้างต้น ซึ่งความเข้มข้นที่มักใช้ในการปลูกเชื้อโดยทั่วไป เช่น เชื้อราจะอยู่ในช่วง 10^5-10^6 สปอร์ / มล . เป็นต้น

2. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส (สุทธิพันธุ์, 2550)

วิธีการวิเคราะห์

นำสารละลายต่างๆ มาผสมกันในหลอดทดลองที่อัตราส่วนดังนี้

สารละลายเอนไซม์	0.5 มิลลิลิตร
สารละลายคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส (CMC)	0.5 มิลลิลิตร*

*(บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 นาที ก่อนเติมสารละลายเอนไซม์)

นำสารละลายผสมไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หยุดการทำงานของเอนไซม์ โดยการเติมสารละลาย DNS จำนวน 2 มิลลิลิตร นำ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

หลอดทดลองไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แช่หลอดทดลองในน้ำเย็น (ประมาณ 0 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่นในหลอดทดลอง จำนวน 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งให้เย็นและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตรฐานกลูโคส และคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (CMCase) โดยกำหนดให้ 1 หน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ (unit) คือปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่ย่อยคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส ให้ได้กลูโคสในปริมาณ 1 ไมโครโมลต่อนาที ในสภาวะที่ใช้ในการทดลอง (อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส, เวลา 30 นาที) ทำการทดลองชุดควบคุมโดยเติมสารละลาย DNS ก่อนเติมสารละลายเอนไซม์ และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

โดยสูตรที่ใช้ในการคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์คือ

$$\text{1 Unit} = \frac{(OD_{sample} - OD_{control}) \times 10^3 \times total\ volume}{slope \times 180 \times 30 \times enzymevolume}$$

2.2 การหากราฟมาตรฐานกลูโคส

การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส สามารถทำได้โดยการเตรียมสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0 mg /ml ทำการทดลองโดยเติมสารละลายกลูโคสอย่างละ 1 ml ลงในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลาย DNS จำนวน 2 ml นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำเย็น 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่น 20 ml ผสมให้เข้ากัน ทิ้งให้เย็นแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm จากนั้นวาดกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (แกน Y) และความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส (แกน X)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ไซแลนเนส (ดัดแปลง Miller,1959)

วิธีการวิเคราะห์

นำสารละลายต่างๆ มาผสมกันในหลอดทดลองที่อัตราส่วนดังนี้

สารละลายเอนไซม์	0.5 มิลลิลิตร
สารละลายไซแลน (from oat spelt)	0.5 มิลลิลิตร*

*(บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 นาที ก่อนเติมสารละลายเอนไซม์)

นำสารละลายผสมไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หยุดการทำงานของเอนไซม์ โดยการเติมสารละลาย DNS จำนวน 2 มิลลิลิตร นำหลอดทดลองไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แช่หลอดทดลองในน้ำเย็น (ประมาณ 0 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่นในหลอดทดลอง จำนวน 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งให้เย็นและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตรฐานไซโลสและคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส โดยกำหนดให้ 1 หน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ (unit) คือปริมาณเอนไซม์ไซแลนเนสที่ย่อยไซแลน ให้ได้ไซโลสในปริมาณ 1 ไมโครโมลต่อนาที ในสภาวะที่ใช้ในการทดลอง (อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส, เวลา 30 นาที) ทำการทดลองชุดควบคุมโดยเติมสารละลาย DNS ก่อนเติมสารละลายเอนไซม์ และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

โดยสูตรที่ใช้ในการคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์คือ

$$\textbf{1 Unit} = \frac{(OD_{sample} - OD_{control}) \times 10^3 \times total\ volume}{slope \times 180 \times 30 \times enzymevolume}$$

2.4 การหากราฟมาตรฐานไซโลส

การเตรียมกราฟมาตรฐานไซโลส สามารถทำได้โดยการเตรียมสารละลายไซโลสที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0 mg /ml ทำการทดลองโดยเติมสารละลายไซโลสอย่างละ 1 ml ลงในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลาย DNS จำนวน 2 ml นำไปแช่ในอ่างน้ำ

ควบคุมอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำเย็น 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่น 20 ml ผสมให้เข้ากัน ทิ้งให้เย็นแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm จากนั้นวาดกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (แกน Y) และความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส (แกน X)

3. การเตรียมสารละลาย DNS

สารละลาย DNS (3,5-Dinitrosalicylic acid) เตรียมโดยชั่ง DNS 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 ml เติมสารละลายด่างลงไปทีละน้อย (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 32 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 300 ลบ.ซม.) คนให้เข้ากัน นำไปอังบนอ่างน้ำร้อน เติมโปแตสเซียมโซเดียม- ตาเตรท (KNa-tartrate) ลงไปทีละน้อยจนครบ 600 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 2 ลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร ใส่ขวดสีชาหุ้มด้วยกระดาษอลูมิเนียม (Aluminium foil) เก็บที่อุณหภูมิห้อง

4. การหาปริมาณความชื้นโดยวิธีอบแห้ง (สุนีย์ และคณะ, 2547)

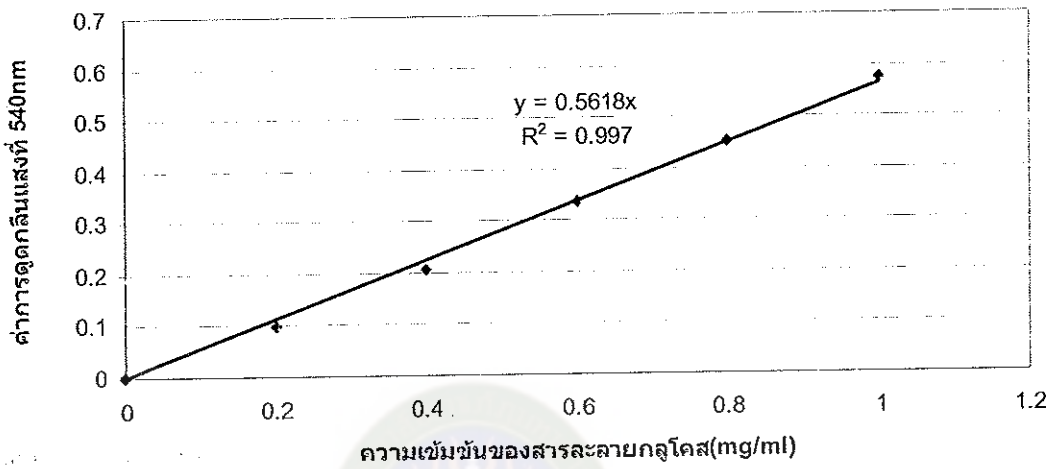
วิธีวิเคราะห์

เตรียมตู้อบไฟฟ้า โดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 105±3°C นำภาชนะอลูมิเนียมพร้อมฝาปิด อบให้แห้งในตู้อบไฟฟ้าที่เตรียมไว้ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในระหว่างอบแง้มฝาเล็กน้อย นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้คีมคีบ จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักจดน้ำหนักที่ชั่งได้ ทำการทดลองซ้ำโดยลดเวลาของการอบเป็น 30 นาที จนผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งได้สองครั้งติดต่อกันไม่มากกว่า 1 มิลลิกรัม จดน้ำหนักที่แน่นอนครั้งสุดท้ายของภาชนะอลูมิเนียมไว้ (X) บดตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน ประมาณ 2 – 5 กรัม ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอนใส่ลงในภาชนะอลูมิเนียมพร้อมฝาปิด (W) จากนั้น นำภาชนะอลูมิเนียม พร้อมฝาปิดที่มีตัวอย่าง อบให้แห้งในตู้อบไฟฟ้าที่เตรียมไว้ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในระหว่างอบแง้มฝาเล็กน้อย นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้คีมคีบ จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักจดน้ำหนักที่ชั่งได้ ทำการทดลองซ้ำโดยลดเวลาของการอบเป็น 30 นาที จนผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งได้สองครั้งติดต่อกันไม่มากกว่า 1 มิลลิกรัม บันทึกน้ำหนักที่ชั่งได้ครั้งสุดท้าย (Y)

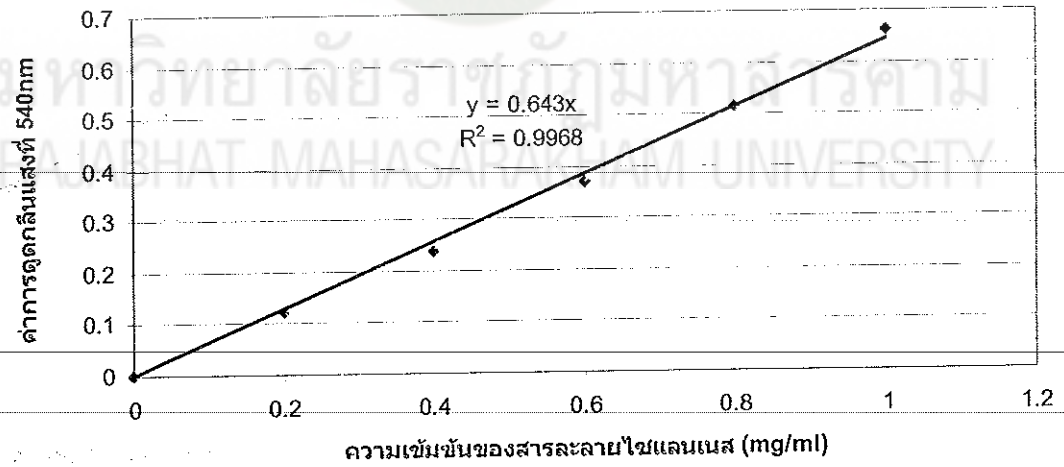
ภาคผนวก ข

ผลการทดลอง

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



ภาพผนวกที่ 4 แสดงกราฟมาตรฐานกลูโคสในการหาค่ากิจกรรมเอนไซม์โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี DNS



ภาพผนวกที่ 5 แสดงกราฟมาตรฐานไซโลสในการหาค่ากิจกรรมเอนไซม์โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี DNS

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวกตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่างๆ

ตัวอย่าง	Cellulose(%)	Hemicellulose (%)	Lignin (%)	Reference
ซังข้าวโพด	31	50.5	15	Worasuwannarak *et al.* (2006)
ชานอ้อย	34.08	20.31	8.93	หรรษา (มปป.)
รำ	27.1	19.4	6.3	Peng *et al.* (2007)
แกลบ	28.6	28.6	24.4	Worasuwannarak *et al.* (2006)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY