อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ฉุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

รา *Rhizopus oligosporus* TISTR 3001 (ATCC22959) จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

2. วัสดุหมัก

วัสดุหมักที่ใช้ในการทดลองได้แก่ ปลายข้าว รำข้าวสาลี รำละเอียด ถั่วเหลือง ถั่วลิสง เมล็ดทานตะวัน และงาดำ เพื่อรักษาสภาวะปลอดเชื้อ ก่อนการถ่ายต้นเชื้อลงในวัสดุหมัก ต้องนำวัสดุหมักไปทำการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที

3. อุปกรณ์วิเคราะห์ต่างๆ

3.1 ตู้เขี่ยเชื้อ

3.2 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส รุ่น memmert IPP 400 บริษัท Schwabach ประเทศ เยอรมัน

3.3 เครื่องเขย่า (orbital shaker) รุ่น SK2-DO บริษัท CTL

3.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น PLC-012 บริษัท Gemmy ประเทศไต้หวัน

3.5 เครื่องวิเคราะห์ความชื้น (moisture analyzer) รุ่น AMB 50 บริษัท Adam Equipment ประเทศอังกฤษ

3.6 เครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์(spectrophotometer) รุ่น Anthekie Advanced บริษัท Secomam ประเทศฝรั่งเศส

3.7 อ่างน้ำอุ่น (water bath) ควบคุมอุณหภูมิน้ำที่ 37 องศาเซลเซียส รุ่น SBD 50 - Cold ยี่ห้อ Heto บริษัท Scientific promotion ประเทศไทย

3.8 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BL210S ยี่ห้อ Sartorius บริษัท Goettingen ประเทศเยอรมัน

3.9 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น LM6100 บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3.10 เครื่องผสม (vortex mixer) รุ่น KMC-1300V บริษัท Vision ประเทศเกาหลี

3.11 เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) รุ่น 420A ยี่ห้อ Orion บริษัทThermo orion ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีการ

1. การเตรียมต้นเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* สำหรับการศึกษาสภาวะในระดับห้องปฏิบัติการ

1.1 การเตรียมสปอร์รา *R. oligosporus* บน PDA

นำต้นเชื้อสด *R. oligosporus* ในสแลนด์หรือหลอดทดลองมาเขี่ยเชื้อเพื่อเพาะเลี้ยงรา *R. oligosporus* บนอาหารวุ้น potato dextrose agar (PDA) ซึ่งเตรียมจากสูตรในภาคผนวก ก ข้อ 1 หลังจากเทลงในจานเลี้ยงเชื้อและรอให้เย็นจนวุ้นในจานเลี้ยงเชื้อแข็ง โดยต้นเชื้อสดหนึ่งสแลนด์จะสามารถเขี่ยเชื้อลงในจานเลี้ยงเชื้อได้ประมาณ 30 จานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน จากนั้นเติมสารละลาย tween 80 ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีราเจริญเติบโตเต็มจานเพาะเชื้อ ทำการลอกสปอร์และเส้นใยราออกจากหน้าวุ้นด้วยลูปเขี่ยเชื้อที่ปลอดเชื้อ

1.2 การเตรียมต้นเชื้อรา *R. oligosporus* บนปลายข้าวในถาด

แช่ปลายข้าว 150 กรัมในน้ำกลั่นนาน 1 ชั่วโมง นำปลายข้าวที่สะเด็ดน้ำใส่ถุงพลาสติกทนร้อนแล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที รอจนปลายข้าวเย็น จากนั้นนำสารละลายสปอร์จากจานเลี้ยงเชื้อ 10 จานมาคลุกกับปลายข้าวให้ทั่วในถาดอลูมิเนียมขนาด 20 × 30 × 5 เซนติเมตร เกลี่ยให้ปลายข้าวกระจายทั่วถาด จะได้ความหนาของปลายข้าวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ปิดด้วยผ้าขาวบาง แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน จากนั้นจึงนำปลายข้าวที่มีราเจริญเติบโตเต็มที่ไปอบแห้งที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน นำไปปั่นผงแล้วตรวจนับจำนวนสปอร์ต่อกรัมผงเชื้อที่ได้ด้วย haemacytometer จะได้ผงสปอร์ที่มีจำนวนสปอร์ 1–5 × 10^{10} สปอร์ต่อกรัม เก็บต้นเชื้อไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส) โดยใช้ฟอยล์หุ้มจุกสำลีเพื่อป้องกันความชื้นเปลี่ยนแปลง รอการนำไปใช้งาน

2. การศึกษาระดับความชื้นที่เหมาะสม

นำรำข้าวสาลีมาชั่งลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 20 กรัมน้ำหนักแห้ง แล้วนำมาปรับความชื้นเป็น 50 55และ 60 เปอร์เซ็นต์ ปิดด้วยจุกสำลีและฟอยล์ นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที รอจนรำข้าวสาลีเย็น จากนั้นถ่ายต้นเชื้อรา *R.*

oligosporus ที่เตรียมจากวิธีการทดลองในข้อ 1.2 ลงไป 1 กรัม (คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง) คลุกให้เข้ากันกับรำข้าวสาลีด้วยแท่งแก้วปลอดเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส ปริมาณกลูโคซามีน ระดับความชื้น และค่าพีเอช

3. <u>การศึกษาวัสดุหมักที่เหมาะสม</u>

3.1 การเตรียมวัสดุหมัก

3.1.1 นำเมล็ดทานตะวัน ทำการแช่น้ำเป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นทำมาบดด้วยเครื่องปั่นเพื่อลดขนาดให้เล็กลงประมาณ 0.3-0.5 เซนติเมตร และนำไปลงหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที

3.1.2 นำถั่วเหลือง ทำการแช่น้ำเป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นนำเปลือกออกและทำการหั่นหรือสับด้วยมีด เพื่อลดขนาดให้เล็กลงประมาณ 0.3-0.5 เซนติเมตร และนำไปลงหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที

3.1.3 นำถั่วลิสงทำการแช่น้ำเป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นนำเปลือกออกและทำการหั่นหรือสับให้มีขนาดเล็กด้วยมีดประมาณ 0.3-0.5 เซนติเมตร และนำไปลงหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที

3.1.4 งาดำทำการแช่น้ำเป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นทำมาบดด้วยเครื่องปั่น เพื่อลดขนาดให้เล็กลงประมาณ 0.298 มิลลิเมตร และนำไปลงหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที

3.2 การศึกษาวัสดุหมักที่เหมาะสม ในระดับห้องปฏิบัติการ

ทำการทดลองโดยนำวัสดุหมัก คือ รำข้าวสาลี รำละเอียด เมล็ดทานตะวัน ถั่วเหลือง ถั่วลิสง และงาดำ อย่างละ 100 เปอร์เซ็นต์ วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่องาเป็น 75:25 เปอร์เซ็นต์ และวัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อกากถั่วเหลืองเป็น 75:25 เปอร์เซ็นต์ ชั่งวัสดุหมักในแต่ละสัดส่วนลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 20 กรัมน้ำหนักแห้ง แล้วนำมาปรับความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักที่เหมาะสม ปิดปากฟลาสก์ด้วยสำลีและหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์อีกชั้นหนึ่ง นำไป

ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที รอจนวัสดุหมักเย็น จากนั้นถ่ายต้นเชื้อรา *R. oligosporus* ที่เตรียมจากวิธีการทดลองในข้อ 1.2 ลงไป 1 กรัม (คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง) คลุกให้เข้ากันกับวัสดุหมักด้วยแท่งแก้วปลอดเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการหมักเป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างวัสดุหมักทุก 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส และปริมาณกลูโคซามีน

3.3 การศึกษาการเติมยูเรียและกลูโคสที่เหมาะสม

ทำการหมักวัสดุหมักที่เหมาะสม (ที่ได้จากวิธีการทดลองที่ 3.2) ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 20 กรัมน้ำหนักแห้ง แล้วนำมาปรับความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักที่เหมาะสมด้วยสารละลายเกลือแร่ซึ่งประกอบไปด้วย ยูเรีย 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของกลูโคส 3 และ 8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง และยูเรีย 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของกลูโคส 3 และ 8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง จากนั้นปิดปากฟลาสก์ด้วยสำลีและหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์อีกชั้นหนึ่ง นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที รอจนวัสดุหมักเย็น จากนั้นถ่ายต้นเชื้อรา *R. oligosporus* ที่เตรียมจากวิธีการทดลองในข้อ 1.2 ลงไป 1 กรัม (คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง) คลุกให้เข้ากันกับวัสดุหมักด้วยแท่งแก้วปลอดเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการหมักเป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างวัสดุหมักทุก 12 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส และปริมาณกลูโคซามีน

3.4 การศึกษาการเติมน้ำมันลงในวัสดุหมัก

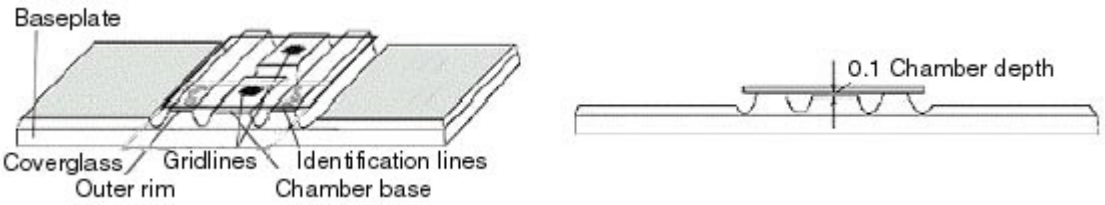
ทำการหมักวัสดุหมักที่เหมาะสม (ที่ได้จากวิธีการทดลองที่ 3.3) ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 20 กรัมน้ำหนักแห้ง แล้วนำมาปรับความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักที่เหมาะสมด้วยสารละลายเกลือแร่ซึ่งประกอบไปด้วย ยูเรีย 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง 8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง และน้ำมันถั่วเหลือง 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง จากนั้นปิดปากฟลาสก์ด้วยสำลีและหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์อีกชั้นหนึ่ง นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที รอจนวัสดุหมักเย็น จากนั้นถ่ายต้นเชื้อรา *R. oligosporus* ที่เตรียมจากวิธีการทดลองในข้อ 1.2 ลงไป 1 กรัม (คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง) คลุกให้เข้ากันกับวัสดุหมักด้วยแท่งแก้วปลอดเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการ

หมักเป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างวัสดุหมักทุก 12 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส และปริมาณกลูโคซามีน

4. <u>การตรวจนับปริมาณสปอร์ราโดยใช้ Haemacytometer (Petreoff-Hausse chamber)</u>

Haemacytometer เป็นอุปกรณ์ใช้นับจำนวนเซลล์หรืออนุภาคอื่นในสารแขวนลอยโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ มีลักษณะเป็นช่องทำจากแก้วชนิดพิเศษที่มีความเที่ยงตรงสูง โดยปกติ haemacytometer เป็นอุปกรณ์ที่ใช้เพื่อวิเคราะห์ส่วนประกอบในเลือด (นับจำนวน leucocytes, erythrocytes และ thrombozytes) และเพื่อนับจำนวนเซลล์ในของเหลวเป็นหลัก นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการนับจำนวนแบคทีเรียและจำนวนสปอร์ของราได้

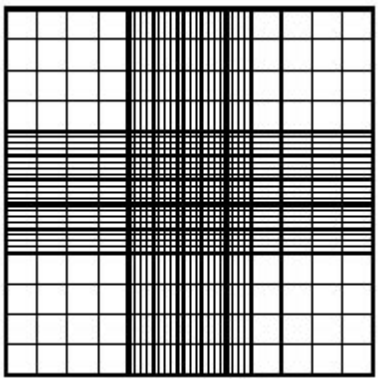
แผ่นกระจกของเครื่อง haemacytometer จะประกอบด้วยร่องตามแนวยาวสี่ร่องในแถบสี่เหลี่ยมผืนผ้า 3 แถบบริเวณกึ่งกลางแผ่น ร่องทั้งสี่จะขนานกับด้านกว้างของแผ่นกระจก และขนาดของแถบสี่เหลี่ยมผืนผ้าทั้ง 3 แถบจะพอดีกับขนาดสไลด์แก้วที่นำมาปิดทับเพื่อนับจำนวนเซลล์ สำหรับพื้นผิวขนาดใหญ่ด้านนอกทั้ง 2 ด้านที่เหลือ จะไม่ได้รับการปรับแต่งให้เรียบเนื่องจากมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการทำเครื่องหมาย สำหรับพื้นผิวบนแถบสี่เหลี่ยมผืนผ้าบริเวณกึ่งกลางแผ่นจะมีผิวเรียบและเป็นมันวาว โดยตารางที่ใช้นับจำนวนเซลล์ซึ่งอยู่บนแถบกลางจะมีความลึกมากกว่าทั้ง 2 แถบที่ขนาบข้าง หากนำสไลด์แก้วมาปิดทับโดยวางแนบสนิทกับแถบสี่เหลี่ยมผืนผ้าด้านข้างทั้ง 2 แถบ จะทำให้ได้ช่องว่างแนวดิ่งระหว่างสไลด์แก้วและแถบสี่เหลี่ยมผืนผ้ากึ่งกลางแผ่น ทำให้ได้ปริมาตรของเหลวที่จะทำการนับจำนวนเซลล์ (chamber base) ดังภาพที่ 5



<u>ภาพที่ 5</u> แผ่นกระจกและสไลด์แก้วของเครื่อง Haemacytometer
ที่มา: Clay (2004)

บนตารางสำหรับนับจำนวนเซลล์ (ภาพที่ 6) จะประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่จำนวน 25 ช่อง แต่ละช่องมีขนาด 0.2 × 0.2 มิลลิเมตร ในแต่ละช่องใหญ่นี้มีขีดแบ่งออกเป็นช่องเล็ก

จำนวน 16 ช่อง แต่ละช่องเล็กมีพื้นที่ 0.05 × 0.05 มิลลิเมตร เมื่อนำสไลด์แก้วมาปิดทับบนแผ่นกระจกจะทำให้มีความสูง 0.1 มิลลิเมตร ดังนั้นจะทำให้เกิดปริมาตรของเหลวที่ต้องการนับจำนวนเซลล์ (chamber base) เป็น 0.00025 (0.05 × 0.05 × 0.1) ลูกบาศก์มิลลิเมตร



ภาพที่ 6 ลักษณะตารางบนแผ่นกระจกสำหรับนับจำนวนเซลล์
ที่มา: Clay (2004)

4.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อนับจำนวนเซลล์

สำหรับตัวอย่างที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักจะต้องทำการย้อมสีด้วยสารละลายไอโอดีนเพื่อทำให้สามารถมองเห็นเซลล์ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น นอกจากนั้นเพื่อการตรวจนับที่ถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น ควรทำการเจือจางจำนวนเซลล์ให้พอเหมาะ โดยจำนวนเซลล์ที่นับได้ควรอยู่ระหว่าง 1–10 เซลล์ต่อหนึ่งช่องเล็ก โดยค่าแฟคเตอร์ของการเจือจาง (dilution factor) มีความสำคัญและนำมาใช้ในการคำนวณกลับไปหาจำนวนเซลล์ที่แท้จริงของสารละลายเริ่มต้น

4.2 การตรวจนับจำนวนเซลล์

4.2.1 ล้างทำความสะอาดแผ่นกระจกและแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่นแล้วซับให้แห้ง

4.2.2 หลังจากเขย่าจนสารละลายเข้ากันดี ใช้ปิเปตต์หยดสารละลายที่ต้องการนับจำนวนเซลล์ลงไปบนตารางซึ่งอยู่บนแผ่นกระจก 2–3 หยดทั้งสองฝั่งของกระจก จากนั้นค่อย ๆ ปิดทับด้วยแผ่นสไลด์ ทำให้สารละลายบรรจุอยู่ในช่องว่างที่จะทำการนับจำนวนเซลล์

4.2.3 หากเกิดฟองอากาศหรือหยดสารละลายลงบนแผ่นกระจกมากเกินไปจนทำให้ไหลล้นลงไปในร่องด้านข้าง จะต้องทำความสะอาดแผ่นกระจก และทำตามขั้นตอนข้างต้นใหม่

4.2.4 นับจำนวนเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์ที่กำลังขยาย 20 เท่า

4.2.5 ความแตกต่างของจำนวนเซลล์ที่นับได้ทั้งหมดจากทั้งสองตารางไม่ควรเกิน10 เซลล์ จากนั้นจึงนำมาหาค่าเฉลี่ยเพื่อใช้ในการคำนวณหาจำนวนเซลล์

4.3 การคำนวณจำนวนเซลล์ที่ตรวจนับได้

4.3.1 สูตรที่ใช้คำนวณจำนวนเซลล์

$$\text{จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรของสารละลาย} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้} \times \text{แฟคเตอร์การเจือจาง}}{\text{จำนวนช่องที่นับ} \times \text{พื้นที่ที่นับ} \times \text{ความสูงของสารละลาย}}$$

5. <u>การหาค่ากิจกรรมเอนไซม์</u>

5.1 การสกัดเอนไซม์

5.1.1 การเตรียมสารเคมีในการสกัดเอนไซม์

ชั่งตัวอย่างวัสดุหมักปริมาณ 10 กรัมน้ำหนักแห้ง (เมื่อวิเคราะห์ความชื้นได้จึงคำนวณกลับเป็นน้ำหนักแห้ง) เติมสารละลายฟอตเฟสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 8.0 (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วดูดส่วนใส 2.0 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที จะได้ส่วนใสไปวิเคราะห์หากิจกรรมไลเปส

5.1.2 การวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส

การวิเคาระห์ค่ากิจกรรมไลเปสตามวิธีของ Hoshino et al. (1992) โดยนำสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง และเติมสารละลาย ข้อ4.4 (ภาคผนวก ก ข้อ 4) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) ความเข้มข้น 2 โมลาร์

(ภาคผนวก ก ข้อ 4) ปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร หากิจกรรมไลเปสโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของของสารละลายมาตรฐาน *p*-nitrophenol ที่ความเข้มข้น 0-0.1 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 1)

กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย *p*-nitrophenyl palmitate แล้วให้ *p*-nitrophenol เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

6. <u>การวิเคราะห์ตัวแปรต่าง ๆ</u>

6.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

นำตัวอย่างวัสดุหมักที่ผ่านการหมักมาทำการวิเคราะห์ความชื้นทันทีด้วยเครื่องวิเคราะห์ความชื้น (moisture analyzer) โดยทำการคลุกเคล้าวัสดุหมักให้เข้ากันให้ดีก่อนทำการวิเคราะห์ความชื้น โดยทำการชั่งวัสดุหมักอย่างน้อย 2 กรัม

6.2 การวัดพีเอช

การวัดค่าพีเอช ตามวิธีของ Han and Anderson (1975) โดยนำตัวอย่างวัสดุหมักที่ทำการอบที่อุณหภูมิ 103±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จำนวน 1 กรัม บดให้ละเอียด เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 คนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้ววัดด้วยเครื่องวัดพีเอช

6.3 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน โดยวิธีของ Morgan-Elson ที่ปรับปรุงแล้ว (Van de Loo, 1976) (ภาคผนวก ก ข้อ 5)

6.3.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีน โดยวิธี Cochran and Vercellotti (1978)

ชั่งตัวอย่างที่อบแห้งที่บดละเอียดแล้ว ปริมาณ 0.25 กรัม เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5.0 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วดูดส่วนใส 2.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีน้ำกลั่น 1.0 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ปรับพีเอชของสารละลายให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 30 เปอร์เซ็นต์และ

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีน

6.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

ใส่สารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย acetyl acetone 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก ข้อ 5) ต้มในน้ำเดือดนาน 20 นาที เติมเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย ehrlich reagent 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร หาปริมาณกลูโคซามีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคซามีนที่ความเข้มข้น 0-300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 2)