อุปกรณ์และวิธี

อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ทดลอง

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดลองมี 2 ชนิด คือ

1.1 รา *Rhizopus oligosporus* (*A. oryzae*) TISTR 3001 (ATCC22959) จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และมีความเข้มของสปอร์ต้นเชื้อเท่ากับ 9×10^9 สปอร์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

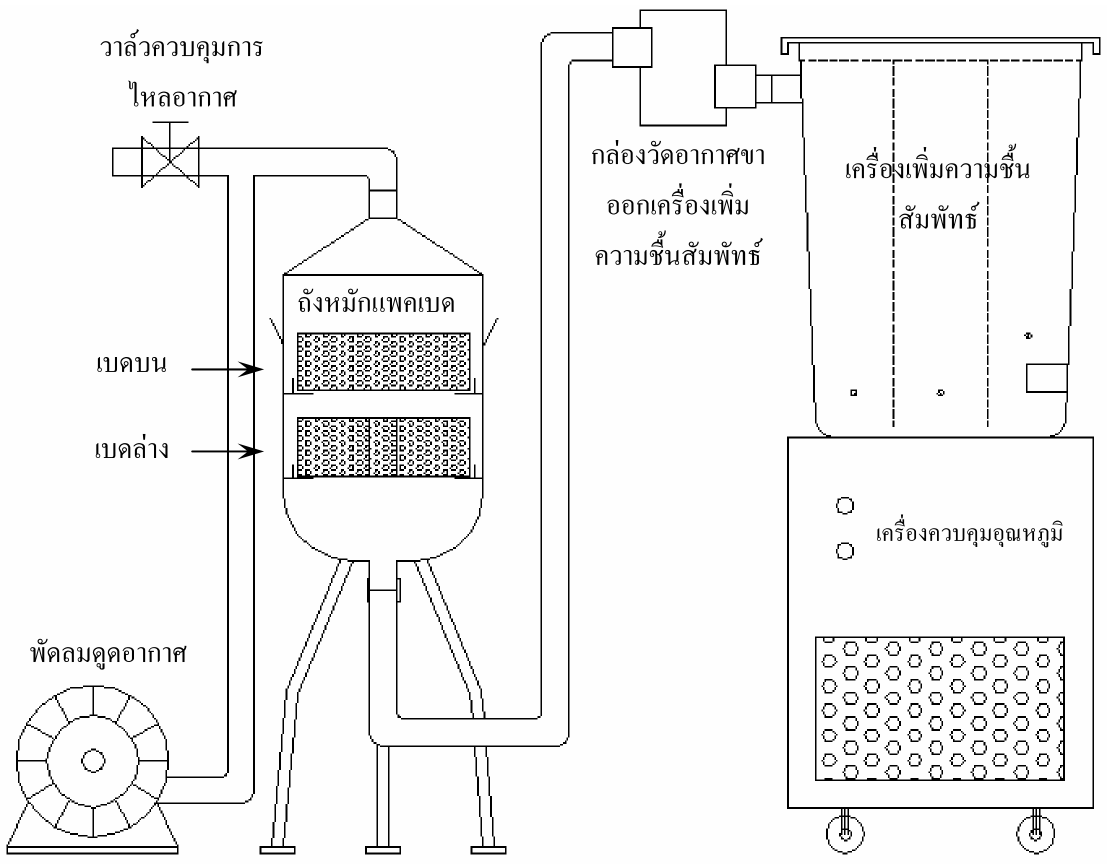
1.2 รา *Aspergillus oryzae* (*R. oligosporus*) มีชื่อทางการค้าว่า Ozykat-1 มีความเข้มข้นของสปอร์ต้นเชื้อเท่ากับ 10^9 สปอร์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง สั่งซื้อจากคุณราตรี มงคลวัย บ้านเลขที่ 47 หมู่ 7 ต.โพสะ อ.เมือง จ. อ่างทอง 14000 โทรศัพท์ 0-3562-0321

2. วัสดุหมัก

วัสดุหมักที่ใช้ในการทดลองเป็นวัสดุที่เหลือใช้จากการเกษตร ได้แก่ กากมันสำปะหลัง รำข้าวเจ้าและรำข้าวสาลี

3. ชุดระบบการหมัก (fermentation system)

ระบบหมักแบบแห้งประกอบด้วยเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ทำหน้าที่เพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศก่อนนำอากาศชื้นไประบายความร้อนในวัสดุหมัก โดยปั้มน้ำสูบน้ำให้กับหัวพ่นละอองน้ำเพื่อใช้ในการเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ซึ่งอยู่ทางด้านล่างของเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ อากาศจะถูกดูดผ่านเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์โดยอากาศเข้าทางด้านล่างและออกทางด้านบนของเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ทางออกเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์มีกล่องพักอากาศ เพื่อช่วยให้การวัดความชื้นสัมพัทธ์ที่ออกจากเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ให้มีความม่นยำ หลังจากนั้นอากาศจะผ่านไปยังถังหมักแพคเบดโดยใช้ท่อพลาสติก อากาศจะเข้าถังหมักแพคเบดทางด้านล่างและออกทางด้านบนของถังหมัก โดยมีพัดลมดูดอากาศทำหน้าที่ดูดอากาศให้ไหลผ่านชุดระบบหมัก ซึ่งพัดลมดูดอากาศอยู่ถัดจากถังหมักแพคเบดดังภาพที่ 27

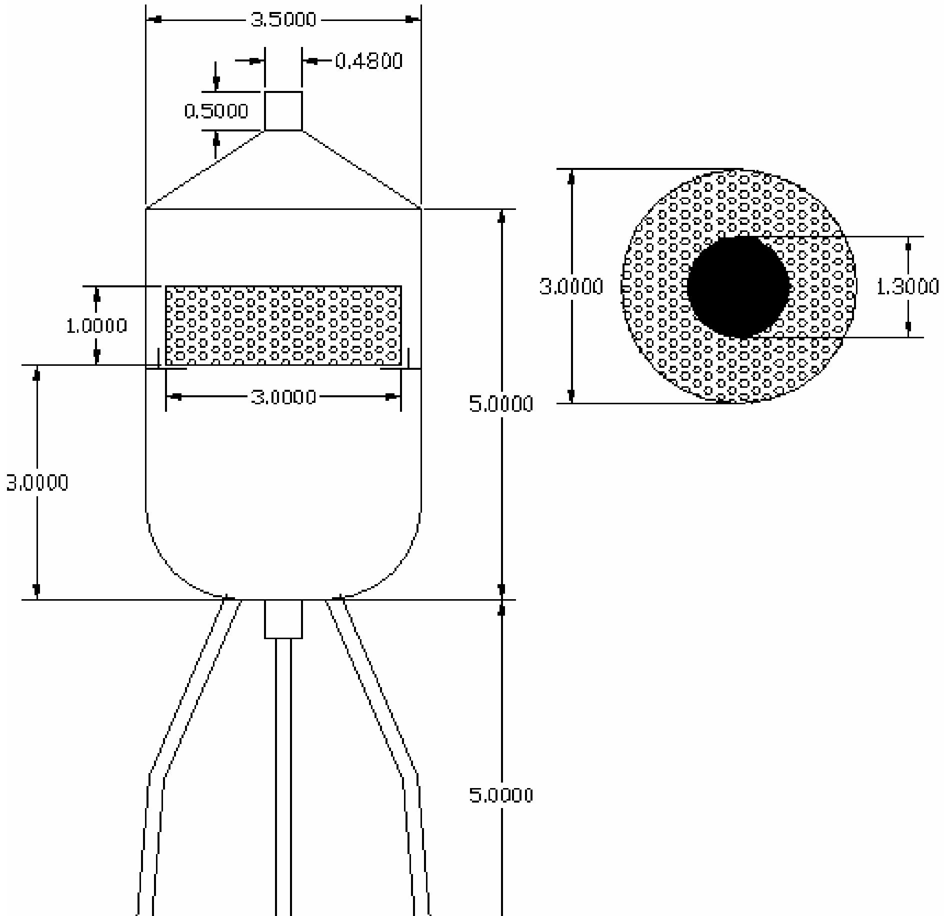


ภาพที่ 27 ระบบการหมักแบบแห้งพร้อมเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์

ภาพที่ 28 รูประบบการหมักพร้อมเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์

3.1 ถังหมักแบบแพคเบด (packed-bed fermentor)

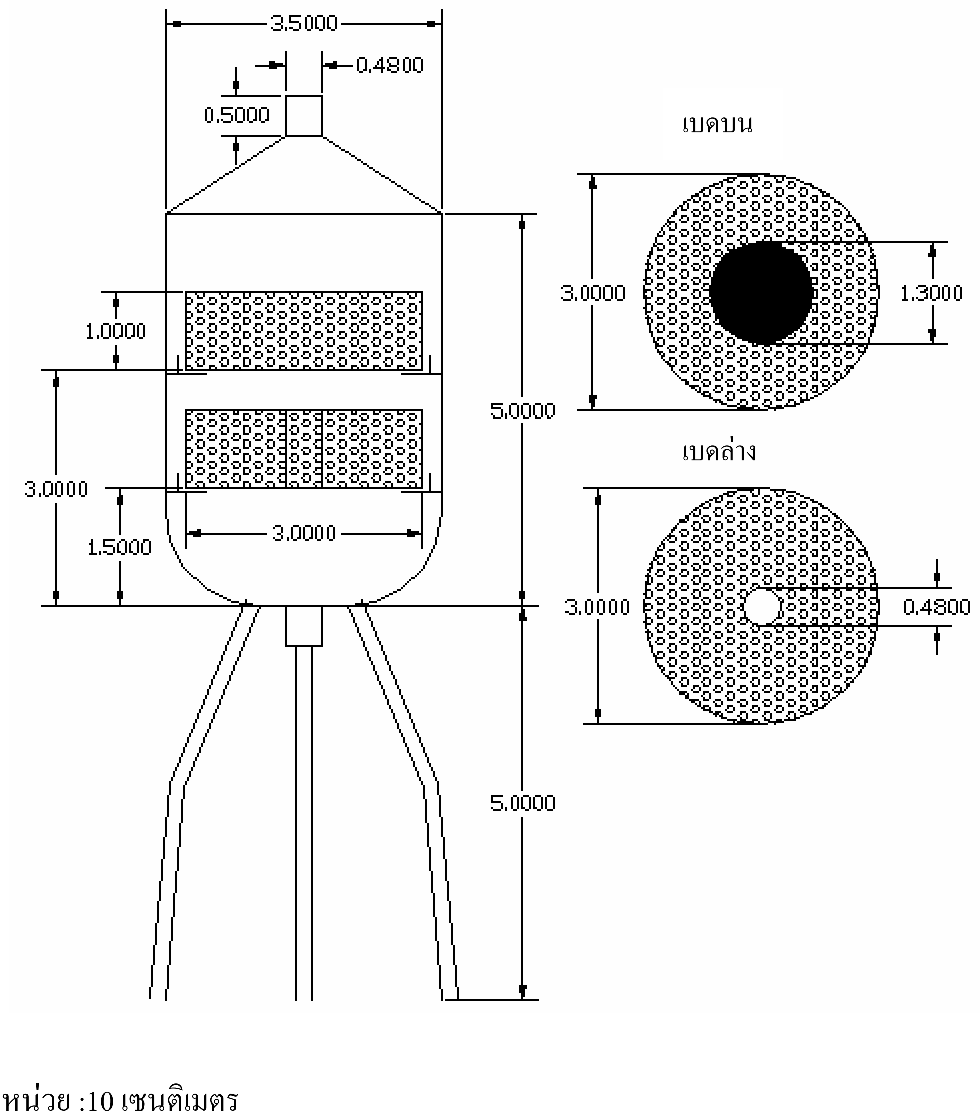
3.1.1 ถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียว ที่ใช้ในการหมักในงานวิจัยมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 เซนติเมตร สูง 50 เซนติเมตร (ไม่รวมฝาปิดถังหมัก) มีปริมาตรโดยรวมประมาณ 50 ลิตร ดังภาพที่ 29 มีอัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางต่อความสูงเท่ากับ 4:5 วัสดุที่ใช้ทำถังหมักเป็นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 ตัวถังประกอบด้วยฝาปิด ทางด้านล่างจะมีช่องให้อากาศไหลเข้าและทางด้านบนมีช่องให้อากาศไหลออก ช่องให้อากาศระบายเข้าและออกมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.8 เซนติเมตร และมีช่องสำหรับเสียบเซนเซอร์วัดอุณหภูมิจำนวน 2 ช่อง ภายในถังหมักมีตะแกรง (เบด) 1 ชั้น ทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร มีรูพรุนรอบตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนเท่ากับ 2 มิลลิเมตร ที่ก้นตะแกรงมีแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมทึบมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 เซนติเมตร เพื่อช่วยกระจายอากาศให้ทั่วถึงตะแกรงชั้นบน ดังภาพที่ 29



อัตราส่วน 1 หน่วย :10 เซนติเมตร

ภาพที่ 29 ถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียว

3.1.2 ถังหมักแพคเบดแบบ 2 ชั้น ที่ใช้ในงานวิจัยมีขนาดเท่ากับถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียว แต่จะมีตะแกรงในถังหมัก 2 ชั้น ดังภาพที่ 30 ตะแกรงทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร มีรูพรุนรอบตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนเท่ากับ 2 มิลลิเมตร ภายในถังหมักสามารถวางตะแกรงได้ 2 ระดับ ที่ความสูง 15 และ30 เซนติเมตร ที่ก้นตะแกรงชั้นบน (เบดบน) มีแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมทึบปิดที่ตรงกลางเพื่อช่วยในการกระจายอากาศให้กับตะแกรงชั้นบน มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 เซนติเมตร และตะแกรงล่างมีการเจาะรูตรงกลาง มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.8 เซนติเมตร เพื่อช่วยให้อากาศไหลผ่านสู่เบดชั้นบนได้สะดวก

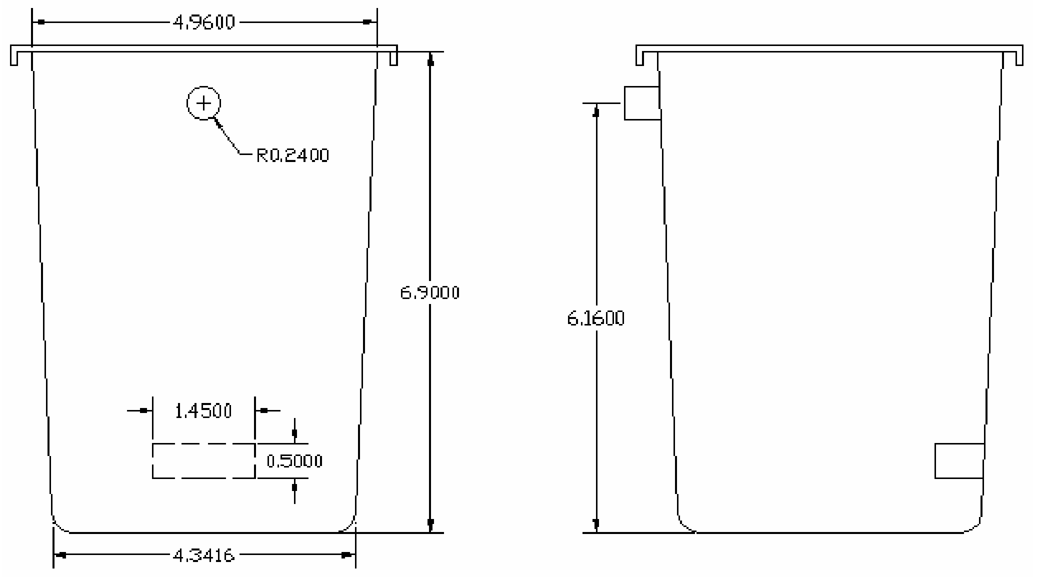


อัตราส่วน 1 หน่วย :10 เซนติเมตร

ภาพที่ 30 ถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น

3.2 เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ (humidifier)

เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ มีลักษณะเป็นถังทรงกระบอก มีเส้นผ่านศูนย์กลางด้านบน 49.6 เซนติเมตร และเส้นผ่านผ่านศูนย์กลางด้านล่าง 43.5 เซนติเมตร สูง 69 เซนติเมตร มีปริมาตรโดยรวม 98 ลิตร ดังแสดงในภาพที่ 31 ถังเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ผลิตจากพลาสติก มีช่องให้อากาศไหลเข้าทางด้านล่างกว้าง 14.5 เซนติเมตร สูง 5 เซนติเมตร ปิดด้วยแผ่นกรองอากาศ และมีช่องให้อากาศไหลออกทางด้านบนมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.8 เซนติเมตร



อัตราส่วน 1 หน่วย :10 เซนติเมตร
ภาพที่ 31 ขนาดเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์

3.3 พัดลมดูดอากาศ (air suction blower)

พัดลมดูดอากาศของบริษัท Greenco รุ่น XBD-750 มีกำลัง 1 แรงม้า ใช้พัดลมดูดอากาศควบคุมอัตราการไหลอากาศภายในถังหมักแพคเบด อากาศไหลเข้าทางด้านล่างแล้วออกทางด้านบนของถังหมักแพคเบด ทางด้านบนของถังหมักแพคเบดมีวาล์ว by pass เพื่อควบคุมอัตราการไหลอากาศภายในถังหมักแพคเบด

3.4 ปั้มน้ำ (water pump)

ปั้มน้ำ รุ่น CBAI ของบริษัท Scientific Promotion ใช้สูบน้ำให้กับหัวพ่นละอองน้ำ

3.5 หัวพ่นละอองน้ำ (water spray)

หัวพ่นละอองน้ำรุ่น mist jet ของบริษัท เรนเบิร์ด (rain bird) ประเทศอเมริกา

3.5 อุปกรณ์ควบคุมตัวแปรภายในถังหมัก

3.5.1 เครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศที่ใช้ในการทดลองมี 2 แบบ ดังนี้

แบบที่ 1 เครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ (Barigo hydrometer รุ่น 420 ประเทศเยอรมัน)

แบบที่ 2 เครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิของอากาศของบริษัท ETT สามารถวัดความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ (เปอร์เซ็นต์) ได้ตั้งแต่ช่วง 0 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และช่วงอุณหภูมิอากาศ 0 ถึง 100 องศาเซลเซียส

3.5.2 เครื่องวัดความเร็วอากาศ (air flow mater) รุ่น hot wire sensor (407112) ของบริษัท Extech Instruments ใช้สำหรับวัดความเร็วอากาศในถังหมัก

3.5.3 เครื่องวัดอุณหภูมิแบบเก็บข้อมูล (multilog datalogger ของ Fourier system รุ่น DB-526, Isarael) พร้อมหัวเซนเซอร์ (thermocouple) สามารถวัดอุณหภูมิได้ในช่วง -25 ถึง 110 องศาเซลเซียส ใช้สำหรับเก็บอุณหภูมิในวัสดุหมัก

4. **<u>อุปกรณ์วิเคราะห์ต่างๆ</u>**

4.1 ตู้ปลอดเชื้อ

4.2 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น LM6100 ของบริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

4.3 เครื่องอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น HL-340 ของบริษัท Huxley

4.4 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น 420A ของบริษัท Orion ประเทศสหรัฐอเมริกา

4.5 เครื่องวิเคราะห์ความชื้นในวัสดุหมัก (moisture analyzer) รุ่น AMB 50 ของบริษัท Adam Equipment ประเทศอังกฤษ

4.6 เครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รุ่น Anthekie Advanced ของบริษัท Secomam ประเทศฝรั่งเศส

วิธีการทดลอง

1. การพัฒนาและการทดสอบเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์

เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ที่ได้พัฒนาใช้ในงานวิจัยนี้ช่วยเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ให้กับอากาศที่ใช้ระบายความร้อนในวัสดุหมักภายในถังหมักแพคเบด เพื่อลดการสูญเสียความชื้นของวัสดุหมักที่เกิดจากอากาศที่ใช้ระบายความร้อนออกจากวัสดุหมัก อากาศพาความชื้นออกจากวัสดุหมัก ดังนั้นจึงได้มีการสร้างเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์เพื่อเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ เพื่อช่วยลดการระเหยของน้ำในวัสดุหมัก นอกจากนั้นเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ยังสามารถลดอุณหภูมิอากาศไปพร้อมกับการเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ และเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศด้วยการพ่นละอองน้ำ โดยพ่นละอองน้ำด้วยอัตราการไหล 72 ลิตรต่อชั่วโมง และใช้อัตราการไหลอากาศ 34.62 ลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมงหรือความเร็วอากาศในถังหมัก 0.1 เมตรต่อวินาที วัดความชื้นสัมพัทธ์ก่อนและหลังผ่านเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ทุก 30 นาที

2. การหมักรา *R. oligosporus* ในถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น ที่ความเร็วอากาศในถังหมัก 0.1 เมตรต่อวินาที

เตรียมวัสดุหมักผสมระหว่างกากมันสำปะหลังกับรำข้าวเจ้าด้วยสัดส่วน 70 ต่อ 30 โดยน้ำหนัก นำวัสดุหมัก 3500 กรัม มาปรับความชื้นวัสดุหมักให้ได้ 55 เปอร์เซ็นต์ (จุฑารัตน์, 2547) หลังจากนั้นนำวัสดุหมักไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 25 นาที นำวัสดุหมักที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ปลอดเชื้อจนวัสดุหมักมีอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส จากนั้นถ่ายต้นเชื้อรา *R. oligosporus* ผงที่เตรียมไว้จำนวน 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักวัสดุหมักหลังจากปรับความชื้น นำต้นเชื้อรา *R. oligosporus* คลุกเคล้ากับวัสดุหมักให้เข้ากัน บรรจุวัสดุหมักที่เตรียมเสร็จลงในตะแกรงกลม (เบด) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ซึ่งตะแกรงถูกแบ่งออกเป็นส่วนๆด้วยแผ่นกั้นพลาสติกออกเป็น 8 ส่วนตามแนวเส้นผ่านศูนย์กลางเพื่อให้อากาศไหลผ่านเบดได้ดี ซึ่งจะช่วยให้การระบายความร้อนในวัสดุหมักเกิดได้ดีขึ้น (จรัญ, 2548) ปรับวัสดุหมักในเบดให้มีความหนา 10 เซนติเมตร นำเบดไปใส่ในถังหมักเพื่อทำการหมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมง เนื่องจากรา *R. oligosporus* มีช่วงการเจริญประมาณ 96 ชั่วโมง (จุฑา

รัตน์, 2547) หลังจากนั้นนำอากาศที่ผ่านเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ที่ได้ออกแบบมาระบายความร้อนภายในวัสดุหมักในชั่วโมงที่ 12 ด้วยความเร็วอากาศในถังหมัก 0.1 เมตรต่อวินาที ให้อัตราการไหลของน้ำภายในเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 72 ลิตรต่อชั่วโมง ทำการหมัก 96 ชั่วโมง วัดอุณหภูมิภายในวัสดุหมักทุก 30 นาที ด้วยเซนเซอร์และเครื่องเก็บข้อมูล วัดความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศขาเข้าและออกจากเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ทุก 30 นาที และเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในวัสดุหมัก และปริมาณกลูโคซามีน

3. <u>การหมักรา *R. oligosporus* ในถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น ที่ความเร็วอากาศในถังหมัก 0.15 เมตรต่อวินาที</u>

เตรียมวัสดุหมักที่ใช้ในการหมักรา *R. oligosporus* เหมือนกับการทดลองที่ 2 หลังจากนั้นนำวัสดุหมักไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที แล้วทิ้งวัสดุหมักให้เย็นในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นถ่ายต้นเชื้อรา *R. oligosporus* ด้วยปริมาณเท่ากับการทดลองที่ 2 นำวัสดุหมักที่คลุกเคล้าต้นเชื้อแล้วบรรจุลงในเบดที่ถูกแบ่งออกเป็น 8 ส่วน และปรับวัสดุหมักให้มีความหนา 10 เซนติเมตร นำเบดที่บรรจุวัสดุหมักเรียบร้อยแล้วใส่ลงในถังหมักแพคเบด และทำการหมักนาน 96 ชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 12 เปิดอากาศเพื่อระบายความร้อนในวัสดุหมัก นำอากาศมาจากเครื่องเพิ่มความชื้นที่เหมาะสมได้จากการทดลองที่ 2 แต่เพิ่มอัตราการไหลอากาศภายในถังหมักแพคเบดเป็น 51.92 ลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง หรือความเร็วอากาศในถังหมักเท่ากับ 0.15 เมตรต่อวินาที เพื่อทดสอบความสามารถในการเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ที่ความเร็วอากาศสูงขึ้น นอกจากนั้นยังช่วยในการระบายความร้อนในวัสดุหมักให้ดียิ่งขึ้น วัดอุณหภูมิภายในวัสดุหมักทุก 30 นาที ด้วยเซนเซอร์และเครื่องเก็บข้อมูล วัดความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศขาเข้าและออกจากเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ทุก 30 นาที และเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในวัสดุหมัก และปริมาณกลูโคซามีน

4. <u>การหมักรา *A. oryzae* ในถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียว ที่ความเร็วอากาศในถังหมัก 0.15 เมตรต่อวินาที</u>

เลี้ยงรา *A. oryzae* บนวัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีกับรำข้าวเจ้า ด้วยสัดส่วน 75 ต่อ 25 โดยน้ำหนัก มาปรับความชื้นวัสดุหมักให้ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ นำวัสดุหมักไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที นำวัสดุหมักมาทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นถ่ายต้นเชื้อรา *A. oryzae* จำนวน 0.3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักวัสดุหมักแห้งผสมกับแป้งจำนวน 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง คลุกรากับวัสดุหมักให้เข้ากันบรรจุลงในตะแกรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร เบดถูกแบ่งออกเป็นส่วนๆด้วยแผ่นกั้นพลาสติกออกเป็น 6 ส่วนตามแนวเส้นผ่านศูนย์กลาง เพื่อให้อากาศผ่าน

เบดได้ดีทำให้การระบายความร้อนในเบดเกิดได้ดี (จุฑารัตน์, 2547) ปรับวัสดุหมักให้หนา 10 เซนติเมตร นำเบดไปลงในถังหมักแพคเบด ปิดฝาถังหมักให้เรียบร้อย เมื่อระยะเวลาหมักครบ 12 ชั่วโมง ให้อากาศที่ผ่านถังเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสม มาระบายความร้อนภายในวัสดุหมักที่เกิดจากการเจริญของรา *A. oryzae* ด้วยความเร็วลมภายในถังหมัก 0.15 เมตรต่อวินาที ทำการหมัก 120 ชั่วโมง เนื่องจากรา *A. oryzae* มีช่วงการเจริญประมาณ 120 ชั่วโมง วัดอุณหภูมิภายในวัสดุหมักทุก 30 นาที ด้วยเซนเซอร์และเครื่องเก็บข้อมูล (data logger) และวัดความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศทุก 30 นาที และเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในวัสดุหมัก และปริมาณกลูโคซามีน

5. <u>การวิเคราะห์ตัวแปรต่างๆ</u>

5.1 วิเคราะห์ความชื้นในวัสดุหมัก

นำตัวอย่างวัสดุหมักที่ผ่านการหมักมาทำการวิเคราะห์ความชื้นทันทีด้วยเครื่องวิเคราะห์ความชื้น (moisture analyzer) คลุกเคล้าตัวอย่างให้เข้ากัน ใส่ตัวอย่างลงในเครื่องวิเคราะห์ความชื้นประมาณ 2 กรัม กดปุ่มให้เครื่องวิเคราะห์ความชื้นวิเคราะห์ปริมาณความชื้นภายในวัสดุหมักจนเครื่องวิเคราะห์ความชื้นวิเคราะห์แล้วเสร็จ อ่านค่าแล้วบันทึกผล

5.2 วิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีน (Cochran and Vercellotti, 1978)

5.2.1 วิธีเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

ในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนต้องเตรียมสารละลายที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนดังนี้

ก. สารละลาย acetyl acetone reagent 4 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในสารละลาย Na_2Co_3 1.25 M เตรียมโดยละลาย Na_2Co_3 จำนวน 6.6244 กรัม ด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ดูดสารละลาย Na_2Co_3 48 มิลลิลิตร แล้วเติม acetyl acetone 2 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

ข. สารละลาย Ehrlich reagent เตรียมโดยชั่ง para-dimethylaminobenzaldehyde 1.6 กรัม เติมไฮโดรคลอริกเข้มข้น และethyl alcohol เข็มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ อย่างละ 30 มิลลิลิตร (เก็บได้ 2-3 วัน)

ค. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 30 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ง. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 M เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

จ. สารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 M เตรียมโดยนำไฮโดรคลอริก 3.093 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ฉ. สารละลายมาตรฐาน glucosamine hydrochloride

- stock solution เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยละลาย glucosamine hydrochloride จำนวน 5 กรัม ด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

- working solution เตรียมโดยนำสารละลาย stock solution ที่เตรียมไว้ มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 25, 50, 100, 150, 200, 250 และ300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

5.2.2 วิธีเตรียมวัสดุหมักเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

นำวัสดุหมักที่ผ่านการหมักที่ชั่วโมงการหมักต่างๆไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน นำวัสดุหมักแห้งมาบดละเอียดมา 0.5 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ 50 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตรลงในวัสดุหมักแห้ง แช่ไว้ 20 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองสารละลายที่แช่ไว้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ดูดส่วนใสที่ผ่านการกรองมา 2 มิลลิลิตร นำมาใส่หลอดทดลองและเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลอง นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับพีเอชสารละลายให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1M และสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1M และปรับปริมาตรสารละลายที่ผ่านการปรับพีเอชให้มีปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

5.2.3 วิธีวิเคราะห์กลูโคซามีน

นำสารละลายตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองเติม acetyl acetone reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลอง พร้อมด้วย blank เตรียมโดยดูดน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติม acetyl acetone reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลอง นำสารละลายตัวอย่างรวมทั้ง blank ไปต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เติมสารละลาย ethyl alcohol เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 10 มิลลิลิตร และสารละลาย Ehrlich reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง เขย่าให้เข้ากัน ให้ตัวอย่างแต่ละตัวอย่างผสมห่างกันตัวอย่างละ 1 นาที ตั้งสารละลายตัวอย่างทิ้ง

ไว้นาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร อ่านและบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากเครื่อง spectrophotometer