

ภาคผนวก ก

การนับและการคำนวณหาความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้นด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

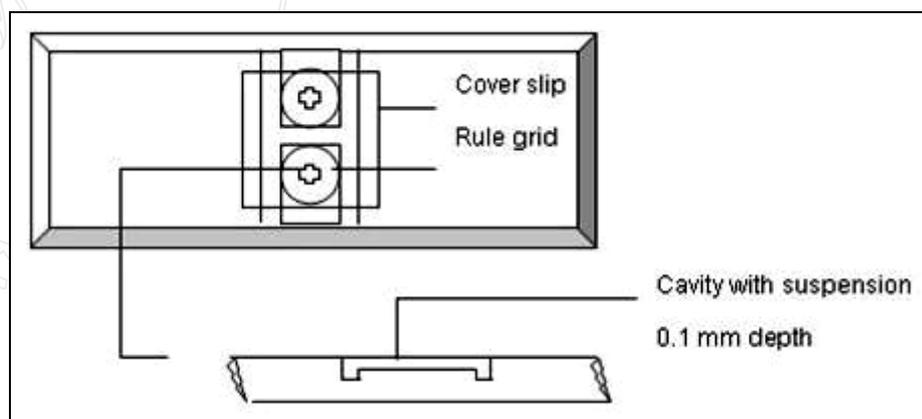
(การเตรียมและการวัดความเข้มข้นของ Inoculum, มปป)

ก่อนการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น ควรทราบวิธีการใช้เครื่องมือนับและคำนวณหาความเข้มข้นที่เรียกว่า ฮีมาไซโตมิเตอร์ซึ่งเป็นอุปกรณ์ขนาดเล็ก มีรูปร่างแสดงดังรูปที่ ก-1 ลักษณะของฮีมาไซโตมิเตอร์คล้ายกับสไลด์ที่มีความหนามากกว่าแก้วธรรมดา ตรงกลางมีร่องเป็นรูปตัว H ซึ่งทำให้เกิดบริเวณที่ใช้ในการตรวจนับขึ้น 2 บริเวณ (รูปที่ ก-2) ตรงกลางตัว H ซึ่งทำเป็นสเกลที่ใช้ในการตรวจนับเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารแขวนลอย เช่น สปอร์ หรือเซลล์ต่างๆ



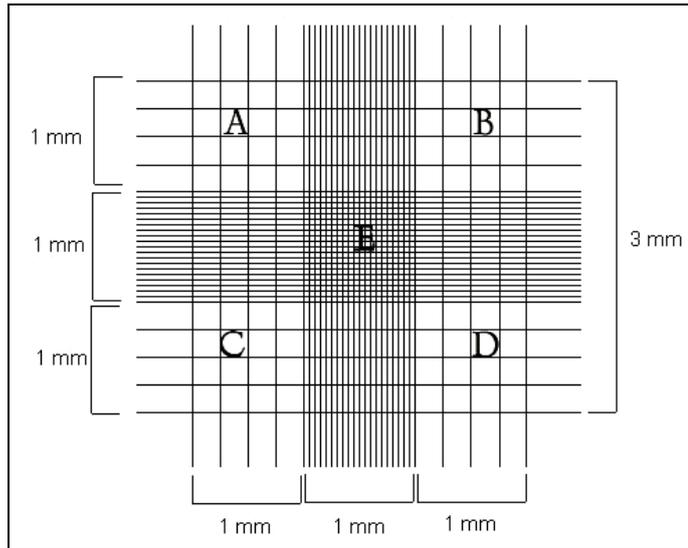
รูปที่ ก-1 ลักษณะและขนาดแท้จริงของฮีมาไซโตมิเตอร์

ที่มา : การเตรียมและการวัดความเข้มข้นของ Inoculum, มปป



รูปที่ ก-2 ลักษณะและตำแหน่งสำหรับการตรวจนับจำนวนตัวอย่างด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

ที่มา : การเตรียมและการวัดความเข้มข้นของ Inoculum, มปป



รูปที่ ก-3 บริเวณที่ใช้นับจำนวน A, B, C, D และ E

ที่มา : การเตรียมและการวัดความเข้มข้นของ Inoculum, มปป

การนับและการคำนวณหาความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้นโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์

1. ในกรณีที่ใช้สเปร์หรือเซลล์ที่ต้องการนับมีขนาดเล็ก การนับควรใช้บริเวณ E ตรงกลาง ซึ่งประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมขนาดเล็กทั้งหมด 25 ช่อง และแต่ละช่องเล็กนั้นจะประกอบด้วยช่องขนาดเล็กที่สุดอยู่ 16 ช่อง การนับสเปร์จำนวนทั้งหมดที่อยู่ในบริเวณนี้ รวมทั้งสเปร์ที่อยู่ในบริเวณขอบของตารางทุกช่องด้วย

2. พื้นที่บริเวณ E เท่ากับ $25 \times 16 \times 1/400$ ตารางมิลลิเมตร

3. หากคิดเป็นปริมาตร (มีความลึก 1/10 มิลลิเมตร) จะเท่ากับ $25 \times 16 \times 1/400 \times 1/10$ ลูกบาศก์มิลลิเมตร หรือ 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

4. สมมุตินับสเปร์ในบริเวณ E ได้รวมทั้งหมดเท่ากับ Y สเปร์ใน 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

5. ต้องการเทียบความเข้มข้นในหน่วย 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร หรือ 1 มิลลิลิตร ซึ่ง 1 มิลลิลิตร เท่ากับ 1000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

ดังนั้น ในปริมาตร 0.1 ลบ.มม. นับสเปร์ได้ = Y สเปร์

ถ้าใน 1000 ลบ.มม (1 มล.) จะมีสเปร์ = $Y \times 1000 \times 1/0.1$ สเปร์

= $Y \times 1 \times 10^4$ สเปร์ / มล.

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

7. การตรวจนับความเข้มข้นจะให้ผลใกล้เคียงมากที่สุด จะต้องทำให้สปอร์หรือเซลล์แขวนลอยกระจายตัวมากที่สุด หรืออาจจำเป็นจะต้องมีการนับหลายๆครั้งขึ้น เช่น 5-10 ครั้ง แล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ยภายหลัง หรือบางครั้งอาจจำเป็นต้องเติม Wetting agent เช่น ทวิน 80 ลงไปเพื่อช่วยให้สปอร์ หรือ เซลล์ กระจายตัวได้ดีขึ้น (ทั้งนี้เพื่อให้การคำนวณความเข้มข้นถูกต้องแม่นยำมากขึ้น) จากนั้นจึงใช้หลอดหยด ไมโครปิเปต หรือหัวจ่ายเชื้อ หยดสปอร์หรือเซลล์แขวนลอยของเชื้อลงบนสเกลของฮีมาไซโตมิเตอร์ข้างละ 1 หยด จากนั้นใช้กระจกปิดสไลด์ปิดทับกดเบา ๆ หากใส่หยดของสปอร์หรือเซลล์แขวนลอยพอดีจะไม่มีเชื้อเหลือล้นออกมาจากสไลด์

8. นำสไลด์ที่เตรียมได้ไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่าจำนวนสปอร์หรือเซลล์ของเชื้อแล้วนำไปคำนวณหาความเข้มข้นโดยวิธีคำนวณข้างต้น ซึ่งความเข้มข้นที่มักใช้ในการเพาะเชื้อโดยทั่วไป เช่น เชื้อราจะอยู่ในช่วง $10^5 - 10^6$ สปอร์ / มิลลิลิตร เป็นต้น

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

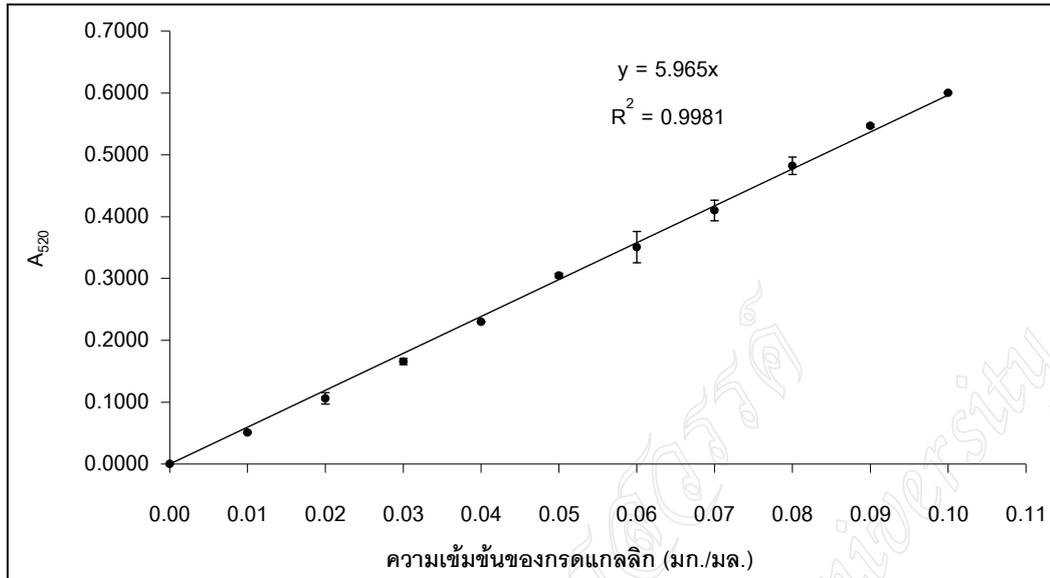
ภาคผนวก ค -1 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกใช้วิธีโรดาเนียน (Van de Lagemaat และ Pyle, 2001) ดังอธิบายไว้ในบทที่ 3 โดยใช้สารละลายกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน ดังตารางที่ ค-1 และนำค่าที่ได้จากตารางที่ ค-1 ไปสร้างกราฟมาตรฐานได้ดังรูปที่ ค-1

ตารางที่ ค-1 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก^A

ความเข้มข้นของกรดแกลลิก (มก./มล.)	A ₅₂₀
0.00	0.0000
0.01	0.0510±0.0015
0.02	0.1063±0.0092
0.03	0.1658±0.0049
0.04	0.2301±0.0001
0.05	0.3049±0.0036
0.06	0.3508±0.0253
0.07	0.4101±0.0168
0.08	0.4822±0.0140
0.09	0.5469±0.0025
0.10	0.6003±0.0001

^A แต่ละความเข้มข้นทำทั้งหมด 3 ซ้ำ และนำค่าที่ได้ทั้งหมดมาคำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (±)



รูปที่ ค-1 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

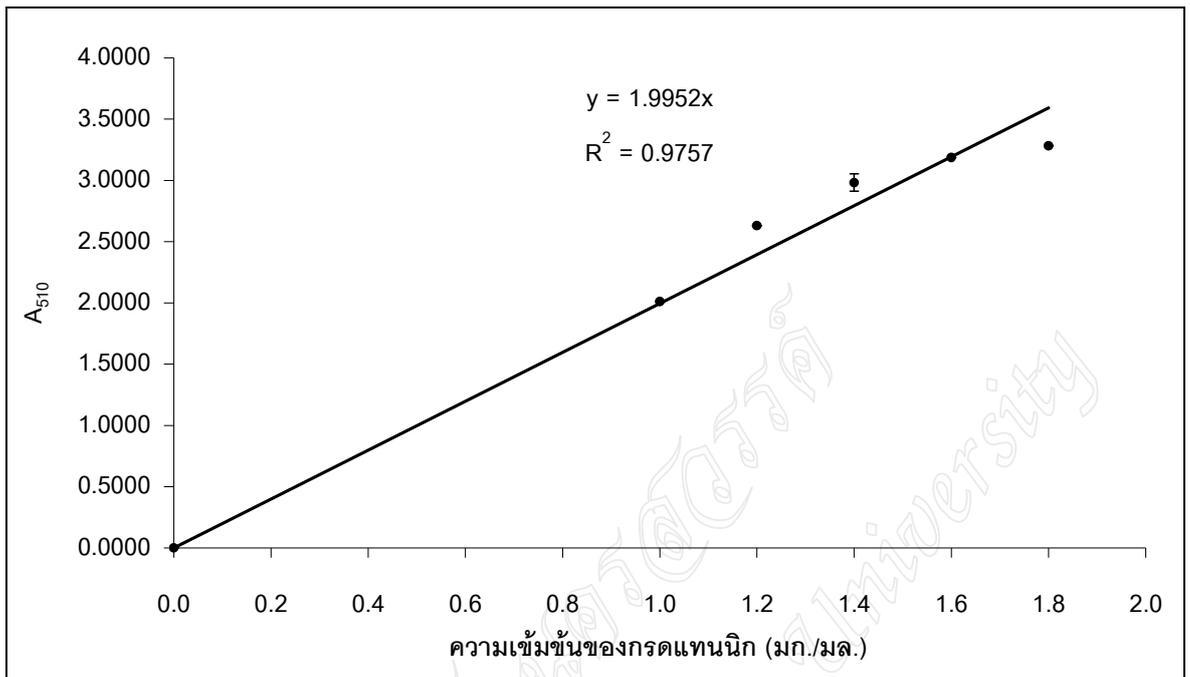
ภาคผนวก ค -2 กราฟมาตรฐานของกรดแทนนิก

กราฟมาตรฐานของกรดแทนนิกใช้วิธีของ Haggerman และ Butler (1978) ดังอธิบายไว้ในบทที่ 3 โดยใช้สารละลายกรดแทนนิก (แทนนินบริสุทธิ์) ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน ดังตารางที่ ค-2 และนำค่าที่ได้จากตารางที่ ค-2 ไปสร้างกราฟมาตรฐานได้ดังรูปที่ ค-2

ตารางที่ ค-2 กราฟมาตรฐานของกรดแทนนิก^B

ความเข้มข้นของกรดแทนนิก (มก./มล.)	A_{510}
0.00	0.0000
1.00	1.8953±0.0030
1.20	2.3595±0.0005
1.40	2.7819±0.0709
1.60	3.0002±0.0000
1.80	3.0578±0.0000
2.00	3.2047±0.0000

^B แต่ละความเข้มข้นทำทั้งหมด 3 ซ้ำ และนำค่าที่ได้ทั้งหมดมาคำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (±)



รูปที่ ค-2 กราฟมาตรฐานของกรดแทนนิก

ภาคผนวก ข

การเตรียมอาหารและสารเคมี

ภาคผนวก ข-1 การเตรียมอาหารแข็ง

อาหารแข็งที่ใช้ในงานวิจัยมี 2 ชนิด ได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA) และ Czapek Dox's minimal agar ที่เติมกากกาแฟสดร้อยละ 2

(1) Potato Dextrose Agar (PDA) (Paterson และ Bridge, 1993) เตรียมในปริมาตร 1 ลิตร

มันฝรั่ง	200	กรัม
กลูโคส	15	กรัม
ผงวุ้น	20	กรัม

(2) Czapek Dox's minimal agar ที่เติมกากกาแฟสดร้อยละ 2 (Bradoo และคณะ, 1996; Paterson และ Bridge, 1993) เตรียมในปริมาตร 1 ลิตร

โซเดียมไนเตรด	6.00	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต	1.52	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์	0.52	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.52	กรัม
แมงกานีสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.01	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.01	กรัม
กลูโคส	10.00	กรัม
ผงวุ้น	15.00	กรัม
กากกาแฟสด	20.00	กรัม

ภาคผนวก ข-2 การเตรียมสารเคมี

(1) สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน (Haggerman และ Butler, 1978)

- สารละลายบัฟเฟอร์ A : กรดอะซิติก 0.20 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 0.17 โมลาร์ ปรับพีเอช เป็น 4.9 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (กรดอะซิติก 11.4 มิลลิลิตร โซเดียมคลอไรด์ 9.86 กรัม เติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 4.9 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น)

- **สารละลาย BSA** : เตรียมสารละลาย BSA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลาย BSA ในสารละลายบัฟเฟอร์ A

- **สารละลาย SDS/TEA** : Triethanolamine (TEA) ร้อยละ 5 ปริมาตรต่อปริมาตร และ SDS ร้อยละ 1 น้ำหนักต่อปริมาตร (TEA 50 มิลลิลิตร SDS 10 กรัม เติมน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร)

- **สารละลายเฟอริกคลอไรด์**: เฟอริกคลอไรด์ 0.01 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก 0.01 โมลาร์ (กรดไฮโดรคลอริก 0.01 โมลาร์ เตรียมโดยการเจือจางกรดไฮโดรคลอริกที่เข้มข้น โดยดูดสารละลายมา 0.83 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้นชั่งเฟอริกคลอไรด์มา 1.62 กรัม ละลายในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.01 โมลาร์ ที่เตรียมไว้แล้ว ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาหลายชั่วโมง จากนั้นให้กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1)

(2) สารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ (Stool และ Blanchard, 1990)

- สารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0

สารละลาย A : สารละลายกรดอะซีติก 0.2 โมลาร์ (กรดอะซีติก 11.55 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : สารละลายโซเดียมอะซีเตต 0.2 โมลาร์ (โซเดียมอะซีเตต 27.22 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ผสมสารละลาย A และ B ปริมาตร 14.8 และ 35.2 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

- สารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 5.0

เตรียมเหมือนกับสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 แต่หลังจากผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกันแล้วไม่ต้องปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ง

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Statistix 7

ง-1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลจากแผนการทดลองการศึกษาดูณภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตกรดแกลลิก

STATISTIX 7.0

PH&TEMP SXW DATA, 20/10/2009, 18:40:26

UNWEIGHTED LEAST SQUARES LINEAR REGRESSION OF GA

PREDICTOR

VARIABLES	COEFFICIENT	STD ERROR	STUDENT'S T	P	VIF
CONSTANT	0.45986	0.00358	128.36	0.0000	
PH	0.00265	0.00537	0.49	0.6291	1.0
TEMP	0.03303	0.00537	6.15	0.0000	1.0

R-SQUARED 0.7170 RESID. MEAN SQUARE (MSE) 2.310E-04

ADJUSTED R-SQUARED 0.6793 STANDARD DEVIATION 0.01520

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REGRESSION	2	0.00878	0.00439	19.00	0.0001
RESIDUAL	15	0.00347	2.310E-04		
TOTAL	17	0.01225			

CASES INCLUDED 18 MISSING CASES 0

\

ง-2 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลจากแผนการทดลองการศึกษาอัตราส่วนของกากกาแฟสด
อบแห้งต่อปริมาตรของอาหารที่เหมาะสม และความเร็วในการเขย่าที่เหมาะสมในการ
ผลิตกรดแกลลิก

STATISTIX 7.0

RATIO&RPM, 20/10/2009, 18:49:35

UNWEIGHTED LEAST SQUARES LINEAR REGRESSION OF GA
PREDICTOR

VARIABLES	COEFFICIENT	STD ERROR	STUDENT'S T	P	VIF
CONSTANT	0.09422	0.00739	12.75	0.0000	
RATIO	0.01463	0.01109	1.32	0.2070	1.0
RPM	0.01913	0.01109	1.72	0.1051	1.0

R-SQUARED 0.2391 RESID. MEAN SQUARE (MSE) 9.837E-04

ADJUSTED R-SQUARED 0.1377 STANDARD DEVIATION 0.03136

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REGRESSION	2	0.00464	0.00232	2.36	0.1288
RESIDUAL	15	0.01476	9.837E-04		
TOTAL	17	0.01939			

CASES INCLUDED 18 MISSING CASES 0

ประวัติผู้วิจัย

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวมาลัยพร ดวงบาล
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Malaiporn Duangban
- ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
- หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ และ e-mail
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์
จ. นครสวรรค์ 60000
โทรศัพท์: 056 219100 (5196) E-mail : malaiporn_d@yahoo.com
- ประวัติการศึกษา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยี)
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
- สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) เทคโนโลยีเอนไซม์
เทคโนโลยีการหมัก เคมีวิเคราะห์
- งานวิจัยที่ตีพิมพ์และเผยแพร่
นำเสนองานวิจัยภาคนิทรรศการในงาน “การนำเสนอผลงานวิจัยแห่งชาติ 2552” (Thailand Research Expo 2009)