

**ภาคผนวก**

1. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการ Dinitrosalicylic acid ของ Miller (1959) (Robertson *et al.*, 2001)

ดูดส่วนใสที่ได้จากข้อ 14.2.3 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย CMC 1.0 เปอร์เซนต์ หรือ Xylan 1.0 เปอร์เซนต์ ที่ละลายใน PBS พีเอช 7.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรใส่ใน microcentrifuge tube จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 850 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาเจือจางด้วย PBS พีเอช 7.5 ในอัตราส่วนที่เหมาะสมจากนั้นดูดส่วนใสที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก จากนั้นเติมสารละลายกรดไคนโตรซาลิไซลิก (DNS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำให้เย็นทันที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรแล้วนำค่าที่ได้มาแทนค่าในสมการมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาลาเนส

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นกลูโคสหรือไซโลส 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (Units/ml)} = \frac{CD}{MtV}$$

C คือ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลส โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน

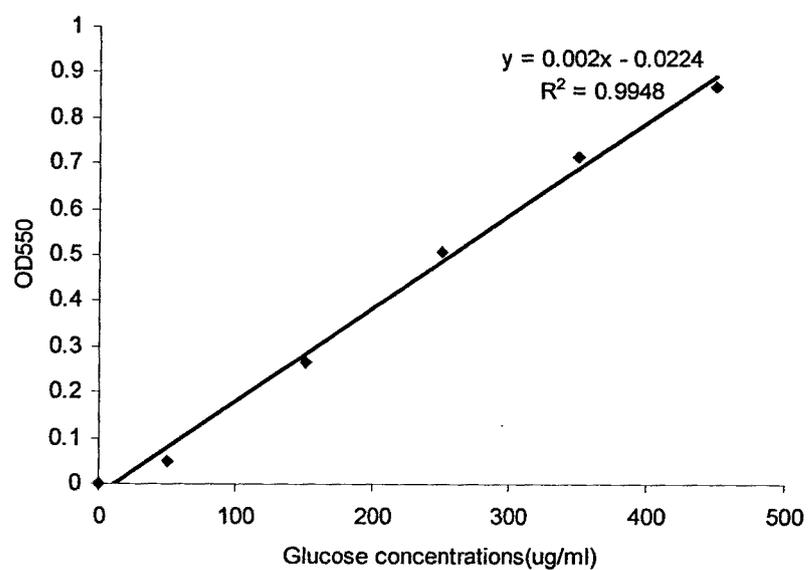
D คือ ค่าการเจือจางตัวอย่างของเอนไซม์

M คือ น้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 180.16 กรัมต่อโมล และน้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลไซโลสเท่ากับ 150.13 กรัมต่อโมล

t คือ ระยะเวลาบ่ม (30 นาที)

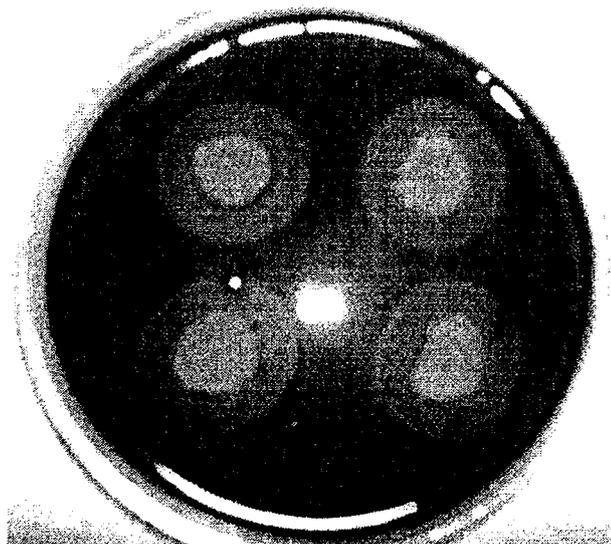
V คือ ปริมาตรของเอนไซม์

## 2. กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส



ภาพที่ 24 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ที่ OD<sub>550</sub>

## 3. กิจกรรมการย่อยสลาย CMC



ภาพที่ 25 การเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 บนอาหารพื้นฐานที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



#### 4. การหาปริมาณน้ำมันและกรีสในน้ำทิ้ง (ดัดแปลงจาก กรรณิการ์ สิริสิงห์, 2522)

สารเคมี

1. ปีโตรเลียม อีเทอร์ (Petroleum ether)
2. กระดาษกรองเบอร์ 40
3. Diatomaceous-silica filter and suspension 10 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร
4. ผ้าขาวบาง

วิธีการวิเคราะห์

1. นำกระดาษกรองวางใน buchner funnel แล้วเทสาร Diatomaceous-silica filter ที่เตรียมไว้ 100 มิลลิลิตร ใช้เครื่องดูดสุญญากาศดูด ล้างด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จนกระทั่งแห้ง
2. กรองตัวอย่างที่เตรียมไว้ แล้วดูดให้แห้ง
3. ใช้ปากคีบกระดาษกรองออกมา ม้วนกระดาษกรองเข้าด้วยกัน แล้วห่อด้วยผ้าขาวบางนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
4. ใสลงในชอคเลต
5. เติมสารตัวทำละลายปีโตรเลียมอีเทอร์ ลงในขวดสกัดไขมัน 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตา
6. ประกอบอุปกรณ์สกัด พร้อมทั้งนำหล่ออุปกรณ์ควบแน่น แล้วเปิดสวิตซ์ให้ความร้อน
7. ใช้เวลาในการสกัด 4 ชั่วโมง เมื่อครบแล้ว กลับเก็บสารละลายจนเหลือสารละลายในขวดสกัดเพียงเล็กน้อย นำตัวอย่างที่ใส่ในหลอดใส่ตัวอย่างออกจากชอคเลต
8. นำขวดสกัดนั้นไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส จนแห้งใช้เวลาประมาณ 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
9. ชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณของกรีสหรือน้ำมัน} = \frac{\text{น้ำหนักของสารที่สกัดได้} \times 1000}{\text{มิลลิกรัมของตัวอย่าง}}$$

