บทที่ 2
วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 แผนและทิศทางการดำเนินการวิจัย

1) ศึกษาลักษณะการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส (extracellular dextranase) ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. X26 ในอาหาร Fukumoto ที่มี 2% DextranT2000 เป็นแหล่งต้นต่อคาร์บอนในสภาวะที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 30° C ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยใช้วิธี Somogyi-Nelson

2) ศึกษาการแยกบริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยใช้ Sephacryl S-300 ตามวิธีของ Wynter (1997)

3) ศึกษาขนาดโมเลกุลโดยใช้ SDS-PAGE และ activity gel staining (Wynter,1997)

4) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ ได้แก่ อุณหภูมิ pH ที่เหมาะสม ความเสถียรและความจำเพาะต่อสารตั้งต้น

5) การทดสอบการย่อยเดกซ์แทรน (dextran) ในน้ำอ้อยในสภาวะที่เลียนแบบกระบวนการหีบสกัดของโรงงานน้ำตาล

2.2 เชื้อจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

เชื้อจุลินทรีย์คือเชื้อรา *Aspergillus* sp. X26 ซึ่งแยกได้จากดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยผู้ร่วมวิจัย คือ ผศ.สุวรรณา เนียมสนิท ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ PDA (Potato Dextrose Agar) และ Fukumoto medium (2% Dextran T 2000, 0.3% $NaNO_3$, 0.2% KH_2PO_4, 0.1%Yeast extract, 0.05% $MgSO_4.7H_2O$, 0.05% KCl, 0.001%$FeSO_4$) (Fukumoto และคณะ, 1971)

สารเคมีที่ใช้เป็น analytical grade ยกเว้น Ammonium sulphate เป็น commercial grade

dextranase standard จาก เชื้อรา *Penicillium* sp. (Sigma,D5884) และ standard protein marker คือ (Myosin, α_2-Macroglobulin, beta-Galactosidase, Transferrin, Glutamic dehydrogenase)

dextranase ชนิดที่ใช้ทดสอบการย่อย dextran ในน้ำอ้อยใช้ชนิด commercial จากบริษัทมิซูบิชิ

2.3 การศึกษาลักษณะการผลิต extracellular dextranase ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. X26

ทำการศึกษาลักษณะการผลิต extracellular dextranase ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. X26 ในอาหาร Fukumoto medium ซึ่งมี 2%dextran T2000 เป็นแหล่งต้นต่อคาร์บอนในสภาวะที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 30° C ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยการติดตามผลิตภัณฑ์ reducing sugar ที่เกิดขึ้นโดยวิธี Somogyi-Nelson หาปริมาณโปรตีน โดยวิธีของ Bradford และหาน้ำหนักของเซลล์แห้ง ที่เวลาต่าง ๆ กัน โดยมีรายละเอียดดังนี้

2.3.1 การเลี้ยงเชื้อและเก็บตัวอย่าง

เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยทำการเขี่ยเชื้อรา *Aspergillus sp.* X26 1 โคโลนีจากอาหารแข็ง ลงในอาหาร Fukumoto stant บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 4-5 วัน ทำ Spore suspension โดยใช้น้ำกลั่นที่มี 0.1% Tween 80 นับสปอร์เชื้อราด้วย Haemacytometer แล้ว inoculate เชื้อให้มีปริมาณ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตรลงในอาหาร Fukumoto (ดูในภาคผนวก) ปริมาณ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มแบบเขย่า ด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 125 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 9 วัน เก็บผลการทดลองทุกๆ 1 วัน (ในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, และ 8 ของการเลี้ยงเชื้อ) โดยนำสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการแยกเซลล์ออกโดยวิธีการปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 g เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ (extracellular dextranase) มาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ โดยเทียบกิจกรรมเอนไซม์ dextranase 1 unit คือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 μmol ของน้ำตาลรีดิวซ์ (glucose) ต่อนาที ที่ 40°C วัดปริมาณโปรตีน และน้ำหนักของเซลล์แห้ง

2.3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

ส่วนผสมของปฏิกิริยาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดจำนวน 1 มิลลิลิตร ประกอบไปด้วยสารละลายของสารตั้งต้นคือ 0.5 ml 0.625% dextran T2000 ใน 0.05M acetate buffer pH 5.5, สารละลายบัฟเฟอร์คือ 0.4 ml 0.05M acetate buffer pH 5.5 และ สารละลายตัวอย่างเอนไซม์ 0.1 ml ผสมให้เข้ากัน บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่ 40°C เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที แล้วทำให้เย็นลงในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำไปตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยเอนไซม์ dextranase 1 unit คือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 μmol ของน้ำตาลรีดิวซ์ (glucose) ต่อนาที ที่ 40°C (ดูรายละเอียดในภาคผนวก) (Wynter,1997)

2.3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somogyi-Nelson

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson ทำโดยนำตัวอย่างปริมาตร 1 ml เติมสารละลาย Alkaline Copper Reagent 1 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 15 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง เติมสารละลาย Nelson Reagent 1 ml ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วเติมกลั่น ปริมาตร 5 ml นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer แล้วหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0-200 μg/ml (ดูรายละเอียดในภาคผนวก)

2.3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้น โดยวิธี Bradford

นำตัวอย่างที่จะทำการวิเคราะห์มา 1 ml เติมสารละลาย Bradford 5 ml ผสมให้เข้ากัน ปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น590 nm นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนจากกราฟสารละลายมาตรฐานของ Bovine serum albumin ที่มีความเข้มข้น 0.2-1.4 μg/ml (ดูรายละเอียดในภาคผนวก)

2.3.5 การหาน้ำหนักของเซลล์แห้ง

ใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 อบที่ 80°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง กรองเซลล์ของเชื้อราที่เจริญอยู่ในสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นนำกระดาษไปอบ ที่ 80°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง จากการนำน้ำหนักกระดาษกรองที่มีเซลล์แห้งลบด้วยน้ำหนักกระดาษกรองเปล่า จะได้น้ำหนักเซลล์แห้งที่มีหน่วยเป็นกรัม (g) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

2.4 การศึกษาการแยกบริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

ได้ทำการศึกษาการแยกบริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยใช้ Sephacryl S-300 และการตกตะกอนด้วยเกลือ ammonium sulphate, $(NH_4)_2SO_4$ ตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ วัดปริมาณโปรตีน และศึกษาความบริสุทธิ์ของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

2.4.1 การแยกบริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยใช้ Sephacryl S-300

ทำการเตรียม Crude extracellular dextranase โดยนำเชื้อราที่เลี้ยงในอาหาร Fukumoto เป็นเวลา 7 วัน มากรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 เอาส่วนที่เป็นสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 g, 4°C g เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำส่วนที่เป็นสารละลายไปวัดค่าปริมาณโปรตีน กิจกรรมของเอนไซม์ และนำไปแยกบริสุทธิ์ต่อด้วย Sephacryl S-300 ทำการแยกบริสุทธิ์บางส่วน ของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดยใช้ Sephacryl S-300 โดยนำเอา crude enzyme

ที่เตรียมไว้จากข้างต้น มาปริมาตร 20 ml เติม Sephacryl S-300 ซึ่ง equilibrate ด้วย 0.05 M citrate buffer, pH 5.0 ตามวิธีของ Wynter (1997) ปริมาณ Sephacryl S-300 ที่ใช้จะแปรผันตามค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่วัดได้ในตัวอย่าง (ใช้ Sephacryl S-300 0.4 g ต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ประมาณ 0.1 – 1 Unit) กวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จะเกิด Sephacryl S-300 dextranase complex จากนั้นนำไปปั่นแยกที่ 12,000 g, 5 นาที เพื่อเอาส่วนสารละลายที่ไม่จับกับ Sephacryl S-300 ทิ้งไป ล้างเอาโปรตีนอื่นออกจาก Sephacryl S-300 dextranase complex ด้วย 0.05 M citrate buffer, pH 5.0 ปริมาตร 20 ml กวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วนำไปปั่นแยกที่ 12,000 g, 5 นาที เอาส่วนที่เป็นสารละลายทิ้งไป นำส่วนตะกอนของ Sephacryl S-300 dextranase complex มาแยกเอาส่วนเอนไซม์ dextranase ออกจาก Sephacryl S-300 ด้วย 2% dextran T10 ใน 0.05 M citrate buffer, pH 5.0 ปริมาตร 10 ml กวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปปั่นแยกที่ 12,000 g, 5 นาที ทำการเก็บส่วนที่เป็นสารละลายซึ่งเป็นส่วนที่มีเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ทำการชะเอาเอนไซม์ที่คงค้างอยู่ออกอีกครั้ง ด้วยวิธีการเดิม นำสารละลายเอนไซม์ไปรวมกับครั้งแรก แล้วทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน ศึกษาความบริสุทธิ์ของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ดังแสดงในข้อ 2.5.1

2.4.2 การแยกบริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยใช้การตกตะกอนด้วยเกลือ **ammonium sulphate แล้วตามด้วย Sephacryl S-300**

ทำการเตรียม Crude extracellular dextranase โดยนำเชื้อราที่เลี้ยงในอาหาร Fukumoto เป็นเวลา 7 วัน มากรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 เอาส่วนที่เป็นสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 g, 4°C g เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนที่เป็นสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อไปตกตะกอนโปรตีนด้วย 80% $(NH_4)_2SO_4$ ที่ 4°C จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 g, 4°C เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนที่เป็นตะกอนโปรตีน (pellet) มาละลายด้วย 0.05 mM citrate buffer pH 5.0 ทำ dialysis ที่ 4°C ข้ามคืน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 g, 4°C เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนสารละลายเอนไซม์ไปแยกบริสุทธิ์ต่อด้วย Sephacryl S-300 เหมือนในข้อ 2.4.1 วัดกิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน ศึกษาความบริสุทธิ์ของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ดังแสดงในข้อ 2.5.1

2.5 การศึกษาขนาดโมเลกุลโของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

การศึกษาขนาดโมเลกุลของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส(dextranase)โดยประมาณทำโดยการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE (Laemmli, 1970)และ Native-PAGE แล้วเปรียบเทียบแถบโปรตีนที่ตรงกับแถบกิจกรรมของเอนไซม์ของ Activity gel staining โดยใช้ dextranase standard จาก เชื้อรา

Penicillium sp. (Sigma,D5884) และ standard protein marker คือ (Myosin, α_2-Macroglobulin, beta-Galactosidase, Transferrin, Glutamic dehydrogenase)

2.5.1 SDS-PAGE

ทำการเตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีโปรตีน 10 μg โดยผสมกับ 2x solubilizing ที่มี β-mercaptoethanol และ SDS ในอัตราส่วน 1:1 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที แล้วนำไปแยกโปรตีนด้วย 10% gel electrophoresis ใน running buffer ที่ 150 volt ย้อมดูแถบโปรตีนด้วย 0.1 % comassie brilliant blue R-250 (ดูรายละเอียดในภาคผนวก) (Wynter,1997)

2.5.2 Native-PAGE

ทำการเตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีโปรตีน 10 μg โดยผสมกับ 2x solubilizing ที่ไม่มี β-mercaptoethanol และ SDS แล้วนำไปแยกโปรตีนด้วย 10% gel electrophoresis (ใช้บัพเฟอร์ Tris-HCl, pH 8.8 ในการเตรียม separating gel) ใน running buffer ที่ 150 volt ย้อมดูแถบโปรตีนด้วย 0.1 % comassie brilliant blue R-250 (ดูรายละเอียดในภาคผนวก) (Wynter,1997)

2.5.3 Activity gel staining

ทำการเตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีโปรตีนประมาณ 10 μg โดยผสมกับ 2x solubilizing ที่ไม่มี β-mercaptoethanol และ SDS แล้วนำไปแยกโปรตีนด้วย 10% gel electrophoresis ที่มี 1% blue dextran เป็นสารตั้งต้น ใน running buffer ที่ 150 volt เสร็จแล้วนำแผ่นเจล มาล้างด้วย triton x-100 ประมาน 1.30 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลมาแช่ใน 0.05 M citrate buffer, pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 ชั่วโมง หรือจนกระทั้งเกิดแถบกิจกรรมของเอนไซม์ (clear zone) ขึ้น (ดูรายละเอียดในภาคผนวก) (Wynter,1997)

2.6 การศึกษาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์เดกแทรนเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus sp.* X26 ในอาหาร Fukumoto ปริมาณ 1,000 มิลิลิตรที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วันตามรายละเอียดของวิธีในข้อ 2.3.1 แล้วนำส่วนของสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำแห้งเพื่อนำไปทดสอบหาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์สกัดหยาบ (crude enzyme) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 2.3.2 แต่บ่มให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันได้แก่ 30- 70°C ใน 0.05M acetate buffer pH 3 -9 จากนั้นนำไปตรวจหาปริมาณ

น้ำตาลรีดิวซ์ คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยเอนไซม์ dextranase 1 unit คือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 μmol ของน้ำตาลรีดิวซ์ (glucose) ต่อนาที ที่ 40°C

2.7 การศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น

ใช้เอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์บางส่วนโดย Sephacryl S-300 เพียงขั้นตอนเดียว ตามข้อ 2.4.1 ในการศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น ได้แก่ dextran T 2000, pectin , amylase และ sucrose ที่มีความเข้มข้น 0.625% (w/v) ใน 0.05M acetate buffer pH 5 นำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ เช่นเดียวกับข้อ 2.3.2 โดยใช้ปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส 0.08 U/ml (reaction) บ่มในอ่างปรับอุณหภูมิ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์

2.8 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

ศึกษาความเสถียรของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสใน crude enzyme ซึ่งได้จากสารละลายในส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการศึกษาการเก็บที่ 4 °C นำมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 2.3.2 ทุกๆ 1 เดือน เป็นเวลา 3 เดือน

2.9 การศึกษาการย่อยเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยโดยสารละลายเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสแบบสกัดหยาบ (crude enzyme)

2.9.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในการย่อยเดกซ์แทรน

เตรียมเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสแบบสกัดหยาบ (crude enzyme)ให้มีความเข้มข้นต่างๆกัน นำไปทำปฏิกิริยากับเดกซ์แทรนที่มีความเข้มข้น 3000 ppm ในสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นเฉลี่ยที่มักพบในน้ำอ้อย (Milintawisamai และคณะ, 2009) บ่มในอ่างปรับอุณหภูมิ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์และวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้โดยวิธี Nelson Somogyi method

2.9.2 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยโดยสารละลายเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสแบบสกัดหยาบ

การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยเดกซ์แทรนในน้ำอ้อย (mixed juice) จากขั้นตอนการหีบสกัดอ้อย โดยใช้สารละลายเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสแบบสกัดหยาบ (crude enzyme) จากเชื้อรา *Aspergillus sp.* X26 เปรียบเทียบกับ commercial grade ในการย่อยเดกซ์แทรน (dextran) ในน้ำอ้อย เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 45 °C ซึ่งเป็นสภาวะเลียนแบบของโรงงานน้ำตาลในขั้นตอนหีบสกัด

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

อ้อย (milling process) ก่อนขั้นตอน liming แล้ววิเคราะห์ปริมาณเดกซ์แทรนที่เหลือด้วยวิธี Haze method (ICUMSA) โดยมีขั้นตอนรายละเอียดดังนี้

1) เตรียมตัวอย่างน้ำอ้อยไปวัดค่าบริกซ์ของน้ำอ้อย และแบ่งน้ำอ้อยส่วนละ 100 มิลลิลิตร มาเติมตัวอย่างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 100, 500 และ 1000 ppm (สำหรับตัวอย่างเอนไซม์ของบริษัท มิซูบิชิ จำกัด จะเติมเฉพาะเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเข้มข้น 1000 ppm)

2) บ่มให้เกิดการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 45 °C เวลา 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วแช่น้ำเย็นทันทีจากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเดกซ์แทรนด้วยวิธี Haze method (ICUMSA) ดังรายละเอียดในข้อ 3-6

3) ปีเปตน้ำอ้อยจากข้อ 2) มา 50 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติม Termamyl 120 L ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (สำหรับตัวอย่างเอนไซม์ของบริษัท มิซูบิชิ จำกัด จะปีเปตมา 100 มิลลิลิตร) บ่มที่อ่างปรับอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที (เขย่าทุกๆ 5 นาที) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

4) เติม TCA Solution ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ปรับปริมาตรด้วยน้ำกรองให้ถึงขีดปริมาตร 100 ml)

5) เติม Celite 6 กรัม แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 42 (SGS เบอร์ 589)

6) แบ่งสารละลายเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 คือ Sample โดยดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปกรวยขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วเติม 95% alcohol ให้ถึงขีดปรับปริมาตร ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 720 nm ภายใน 3-4 นาที ส่วน 2 คือ Blank โดยดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปกรวยขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ถึงขีดปรับปริมาตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 720 nm

7) หาปริมาณเดกซ์แทรน โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเดกซ์แทรน 0- 3000 ppm

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 31 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน 250343
เลขเรียกหนังสือ