

ภาคผนวก

1.อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 YM agar

glucose	10 กรัม
peptone	5 กรัม
malt extract	3 กรัม
yeast extract	3 กรัม
agar	15 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

1.2 YM medium

มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับ YM agar แต่ไม่เติม agar ลงไปเท่านั้น

1.3 Starch agar

peptone	2 กรัม
yeast extract	1 กรัม
soluble starch	1 กรัม
agar	1.5 กรัม

ปรับปริมาตรน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

1.4 Fermentation medium

peptone	5 กรัม
malt extract	3 กรัม
yeast extract	3 กรัม

แบ่งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 เปอร์เซ็นต์ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

2. วิธีวิเคราะห์

2.1 การวัดปริมาณ Reducing sugar โดยวิธี 3,5-Dinitrosalicylic acid.

วิธีการนี้สามารถใช้ตรวจหาปริมาณน้ำตาลพวก Reducing sugar ในช่วงระหว่าง 5-500 ไมโครกรัม (Glucose equivalent)

วัสดุและสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

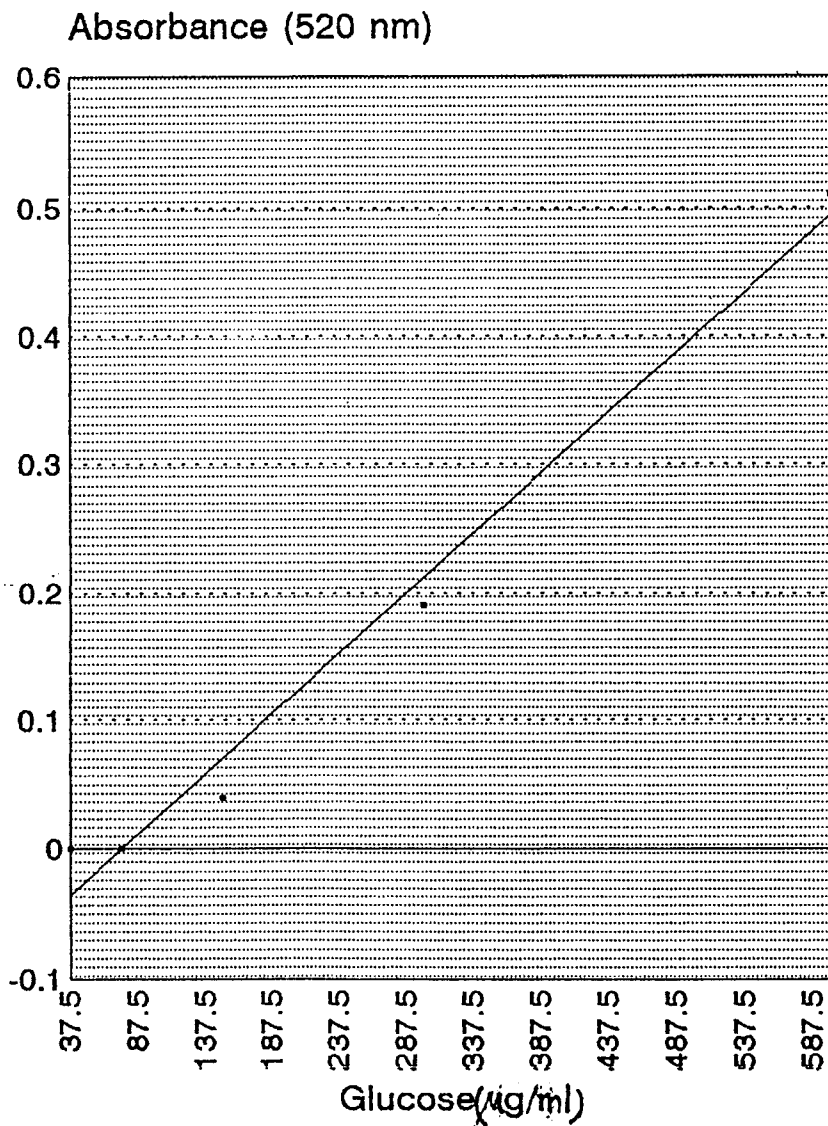
1. 2 N NaOH 50 มล. (4 กรัม/50 มล.)
2. DNS solution เตรียมโดยละลาย 3,5 Dinitrosalicylic acid (DNS) 2.5 กรัม ลงใน 50 มล. ของ 2 N NaOH เติม Sodium potassium tartrate (Rochelle salt) 75 กรัมและคนจนละลายหมด เติมน้ำให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 250 มล. เก็บในขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิห้องสามารถเก็บไว้ใช้ได้นานหลายอาทิตย์

วิธีการทดลอง

- 1) ดูด Samples ที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลจำนวน 0.1-1.0 มล. ใส่ลงในหลอดแก้วสำหรับหลอด blank ใช้ น้ำหรือบัฟเฟอร์แทนสามารถทำได้ครั้งละหลาย Samples
- 2) เติม DNS solution 1 มล. ผสมให้เข้ากัน
- 3) ต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที ในระหว่างต้มควรวอร์ชลูกแก้ววางบนปากหลอดแก้ว เพื่อลดการระเหยของน้ำ ลูกแก้วควรมีขนาดใหญ่กว่าปากหลอดพอควร เพื่อกันไม่ให้ลูกแก้วตกลงในหลอด (ลูกแก้วที่จะนำมาใช้ได้ในการทดลองเป็นชนิดเดียวกับที่เด็กๆ ใช้เล่นกันได้)
- 4) ทิ้งให้เย็นโดยรวดเร็ว โดยการนำหลอดแก้วมาแช่ในน้ำแข็งที่ละลาย หรือใส่ในอ่างน้ำที่เปิดให้น้ำไหลตลอดเวลา
- 5) เติมน้ำ 10 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปตรวจวัดค่า Absorbance ในเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และนำค่า Absorbance ที่วัดได้ไปหาความเข้มข้นของน้ำตาลในหน่วยกรัมต่อลิตรจากกราฟมาตรฐานโดยนำค่าที่อ่านได้มาหารด้วย 1,000
6. สร้างกราฟมาตรฐานของกลูโคสโดยใช้กลูโคสเข้มข้น 37.5, 75.0, 150.0, 300.0 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง ได้ผลตามตารางที่ 12 และ รูปที่ 11

ตารางที่ 12 ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้นของกลูโคสต่างๆกัน

ปริมาณกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 520 นาโนเมตร
37.5	0.00
75.0	0.00
150.0	0.04
300.0	0.19
600.0	0.51



รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานของการหาปริมาณกลูโคส

2.2 การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

- 1) อบกระตาศอลูมิเนียมพอยด์ที่พับเป็นกระทงที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง นำไปทำให้เย็นใน desiccator แล้วนำมาชั่งน้ำหนักโดยละเอียด
- 2) บีบสารละลายของเชื้อลงบนกระทงกระตาศอลูมิเนียมพอยด์ 5 มล.
- 3) นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส จนแห้งนำไปทำให้เย็นใน desiccator แล้วนำมาชั่งน้ำหนักจนน้ำหนักคงที่โดยใช้เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- 4) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคือ น้ำหนักของเซลล์จุลินทรีย์ต่ออาหาร 5 มล.

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Crude Fat) โดยวิธี Soxhlet Extraction

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องสกัดไขมัน (soxhlet extraction apparatus)
2. fat extraction thimble
3. เตารอบ
4. hot plate
5. desiccator

สารเคมี

1. dichloromethane

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างอาหารอย่างละเอียด 3-5 กรัม ใส่ใน extraction thimble พร้อมอุดจุกด้วยสำลี หลังจากนั้นใส่ลงในหลอดที่ต่อเข้ากับ condenser
2. ชั่งน้ำหนักขวดก้นกลมที่มี bumping stone อยู่ 2 เม็ด หลังจากที่ได้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
3. เติม dichloromethane ลงในขวดก้นกลมประมาณ 3/4 ของขวด แล้วต่อเข้ากับเครื่องกลั่น จากนั้นเปิด hot plate ให้สูงพอที่จะกลั่นสารละลาย ให้ไหลกลับลงในขวดได้ 15 รอบ/ชั่วโมง ใช้เวลาประมาณ 6-8 ชั่วโมง หรือจะดูจนกระทั่งไขมันถูกชะจาก thimble ลงในขวดก้นกลมหมดแล้ว ซึ่งสังเกตจากสารละลายที่ไหลออกจาก thimble ไม่มีสี
4. เอา thimble ออกจากหลอด แล้วกลั่นต่อไปจน dichloromethane กลับขึ้นมาอยู่บนหลอดจนเกือบหมด เท dichloromethane เก็บไว้ใช้ในครั้งต่อไป

5. ตั้งขวดทิ้งไว้ 1 คืน แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นใน desiccator ชั่งน้ำหนักขวดกันกลมอีกครั้ง

การคำนวณ

$$\text{crude fat (\%)} = \frac{(B - A) \times 100}{C}$$

A = น้ำหนักขวดกันกลมเปล่า (กรัม)

B = น้ำหนักขวดกันกลม + น้ำหนักไขมันที่สกัดได้ (กรัม)

C = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

2.4 วิธีวิเคราะห์หาไนโตรเจน, โปรตีน (Kjeldahl Method)

สารเคมี

1) Conc. H₂SO₄ (BARER ANALYZ ED A.C.S. Reagent) ของบริษัท J.T. Baker

2) K₂SO₄ (or anhydrous Na₂SO₄) (AR grade) ของบริษัท CARLO ERBA

3) CuSO₄ . 5H₂O (Analyticals grade) ของบริษัท CARLO ERBA

4) 4% Boric acid (Pre ACS analysis) ของบริษัท MEREK

5) 4% Boric acid (Pre ACS analysis) บริษัท CARLO ERBA

6) Standard 0.1 N H₂SO₄ (BAKER ANALYZED A.C.S Reagent) ของบริษัท J.T. BAKER

7) Indicator

0.625 กรัม methyl red, 0.480 กรัม methylene blue ใน 500 มล. 95% ethyl alcohol

หรือ 0.1% methyl red in alcohol 1 ส่วนผสมกับ 0.1% bromocresol green in alcohol 5 ส่วน

(Bromocresol Green Standard Fluka for Microscopy ของบริษัท Fluka, Methyl Red Standard Fluka ของบริษัท Fluka)

เครื่องมือแก้ว

1) Kjeldahl flask ขนาด 250 มล.

2) ชุดกลั่นไนโตรเจน รุ่น 7512 ของบริษัท Gerhardt, Germany

3) ชุดย่อย รุ่น TUR/K ของบริษัท Gerhardt

วิธีทำ แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. การย่อยสลาย (Digestion)

- 1.1 ชั่งตัวอย่างประมาณ 0.7-2.2 กรัม ใส่ใน Kjeldahl flask
- 1.2 เติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 กรัม และ K_2SO_4 10 กรัม
- 1.3 เติม Conc. H_2SO_4 25 มล. (ถ้าชั่งตัวอย่างมากกว่า 2.2 กรัม ให้เพิ่ม Conc. H_2SO_4 10 มล. ทุก 1 กรัมที่เพิ่มขึ้น)
- 1.4 นำ Kjeldahl flask ไปตั้งบนเตาย่อย เริ่มจากไฟอ่อนๆ ก่อน รอจนควันจางจึงใช้ไฟแรงย่อยจนได้สารละลายใส (อาจจะย่อยต่ออีก 1 ชั่วโมง เพื่อให้แน่ใจว่าปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้ว และถ้าที่คอของ Kjeldahl flask มีจุดด่างๆ ให้ทิ้ง Kjeldahl flask จนเย็น ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วย่อยต่อไปใหม่)

2. การกลั่น (Distillation)

- 2.1 นำตัวอย่างที่ย่อยเสร็จ ทิ้งให้เป็นแล้วเติมน้ำ 200 มล.
- 2.2 เติม pumice stone (กัน bumping)
- 2.3 ต่อ Kjeldahl flask เข้าเครื่องกลั่น ให้ปลายด้านหนึ่งของ condenser จุ่มใน 4% boric acid 50 มล.
- 2.4 เติม 40% NaOH ลงใน Kjeldahl flask 70-100 มล.
- 2.5 กลั่นจนได้แอมโมเนียออกมาประมาณ 150 มล. เก็บใน boric acid

3. การไตเตรท (Titration)

- 3.1 นำตัวอย่างที่กลั่นได้มา titrate กับ standard 0.1 N H_2SO_4 โดยใช้ indicator ที่เหมาะสม

* ตรวจสอบค่า blank โดยทำเช่นเดียวกัน แต่ไม่มีตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(\text{มล. H}_2\text{SO}_4 - \text{มล. blank}) \times \text{normality of acid} \times 0.014 \times 100}{\text{weight of sample}}$$

$$\% \text{ Protein} = \% \text{ Nitrogen} \times 6.25$$

5. การหาปริมาณแป้งโดยวิธี Iodine method.

สารเคมีและรีเอเจนต์

1) Starch standard. (stock)

ก) Na_2HPO_4	1.33 กรัม
Benzoic	0.43 กรัม
น้ำกลั่น	60 มล.

นำไปต้มพร้อมกับผสมจนละลายในบีกเกอร์ขนาด 250 มล.

ข) สารละลายแป้ง (soluble starch, AR grade) 0.1 กรัม
ใส่ใน Beaker ขนาด 50 มล. ละลายด้วยน้ำเป็นประมาณ 5 มล.

ค) เทสารละลาย (ข) ใส่สารละลาย (ก) ขณะที่สารละลาย (ก)
กำลังเดือด ผสมจนละลาย ทั้งไว้ให้เย็น และปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ด้วย
น้ำกลั่น (เข้มข้น 0.1 กรัม/100 มล. หรือ 1 กรัม/ลิตร)

2) เตรียม Standard soluble starch ที่มีความเข้มข้น 1, 0.5,
0.25 และ 0.125 กรัม/ลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเจือจาง

3) Stock iodine solution 0.1 โมล/ลิตร, เตรียม 100 มล.

KIO_3 (Pot. periodate) 0.3567 กรัม

KI (Pot. iodide) 4.5 กรัม

ใส่ใน volumetric flask 100 มล. ใส่น้ำกลั่น 30 มล.

ผสมให้เข้ากันแล้วค่อยๆ เติมกรด เข้มข้น HCL 0.9 มล. ลงไป

ผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

4) Working iodine solution:

ใช้ Stock ข้อ 3) 10 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100
มล. ใน Volumetric flask (เก็บตู้เย็น)

วิธีทำ

Starch standard หรือ Sample 1 มล.

+ H_2O 4 มล.

+ Working iodine 1 มล.

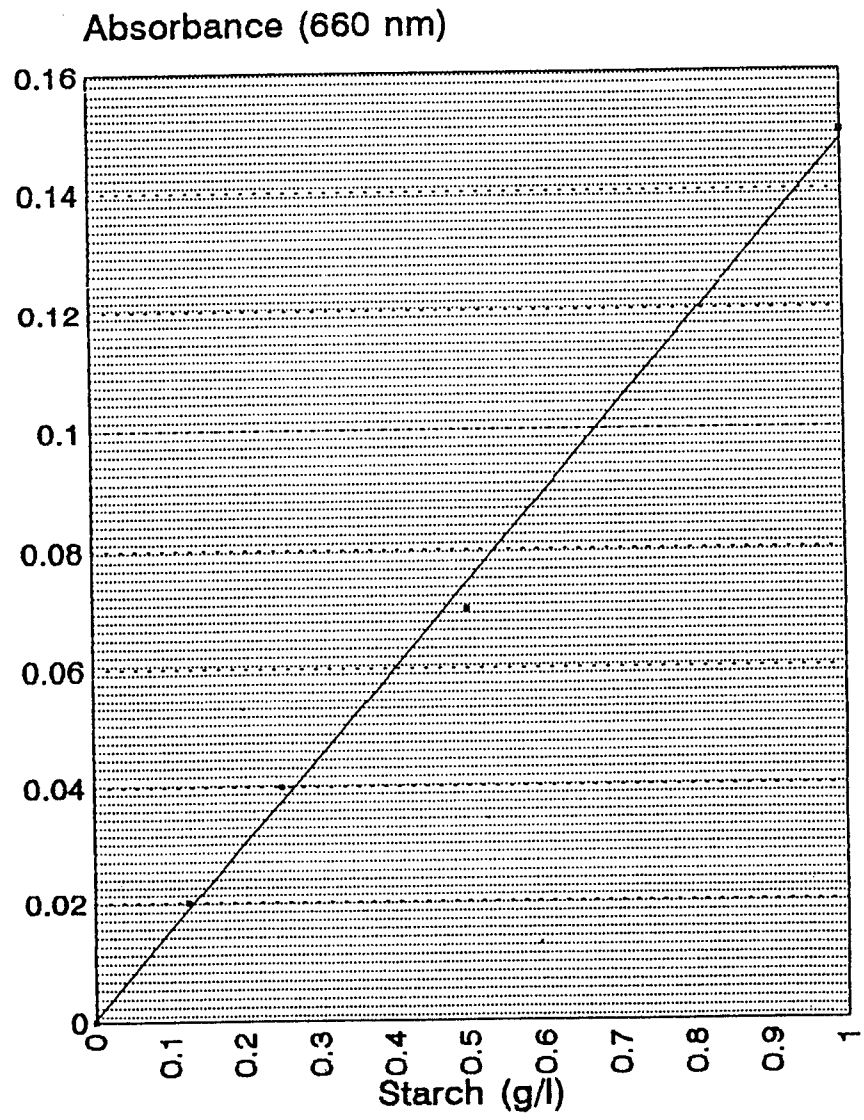
เติมน้ำจนครบ 50 มล.

นำไปวัดค่า Absorbance ที่ 660 นาโนเมตร และนำค่า
Absorbance ที่วัดได้ไปเทียบหาความเข้มข้นของแป้งในหน่วยกรัมต่อลิตรจากกราฟ
มาตรฐาน

5. สร้างกราฟมาตรฐานของแป้งโดยใช้สารละลายแป้งเข้มข้น 0.12,
0.25, 0.50 และ 1.00 กรัมต่อลิตรแทนสารละลายตัวอย่าง และวัดค่าการดูด
กลืนของแสงที่ 660 นาโนเมตร ได้ผลตามตารางที่ 13 และรูปที่ 12

ตารางที่ 13 แสดงค่าการดูดกลืนของแสงที่ 660 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้นของแป้งต่างๆกัน

ปริมาณแป้ง (กรัมต่อลิตร)	A ₆₆₀
0.00	0.00
0.12	0.02
0.25	0.04
0.50	0.07
1.00	0.15



รูปที่ 12 กราฟมาตรฐานของการหาปริมาณแป้ง

2.6 หาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (soluble protein) โดยวิธี Lowry's method :

เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุด วิธีนี้ประยุกต์มาจากวิธีไบยูเรท โดยที่เริ่มแรกจะใช้สารละลายคอปเปอร์ไบทาบพิกริยากับโปรตีนภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu (Phosphomolybdic-phosphotungstic mixed acid) ลงไปกรดนี้จะปรีดิซคอปเปอร์คอมเพล็กซ์ให้เป็นสารละลายสีน้ำเงินเข้มปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมที่จะใช้หาปริมาณคือระหว่าง 0.1-1 มก./มล. ซึ่งทำให้วิธีนี้มีความไวมากกว่าวิธีของไบยูเรท

วัสดุและสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลาย A : 1% (w/v) คอปเปอร์ ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
2. สารละลาย B : 2% (w/v) โซเดียมโปแตสเซียม ทาร์เทรต (Sodium potassium tartrate)
3. สารละลาย C : 0.2 M โซเดียม ไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)
4. สารละลาย D : 4% (w/v) โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate)

สารละลายเหล่านี้เก็บที่อุณหภูมิห้องได้

5. Folin-Ciocalteu reagent

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลาย E โดยผสมสารละลาย C 49 มล. กับสารละลาย D 49 มล. แล้วเติมสารละลาย A 1 มล. จากนั้นจึงใส่สารละลาย B 1 มล. สารละลาย E ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อน ทำการทดลอง

2. เจือจาง Folin-Ciocalteu reagent ในอัตราส่วน 1:1 ด้วยน้ำกลั่นเรียกว่า สารละลาย F

3. ใส่น้ำตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน (โดยมีค่าโปรตีนไม่เกิน 0.5 มก.) 0.5 มล. เติมสารละลาย E 2.5 มล. เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

4. ใส่น้ำสารละลาย F 0.25 มล. ลงไปในหลอดไต ข้อ 3

5. เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

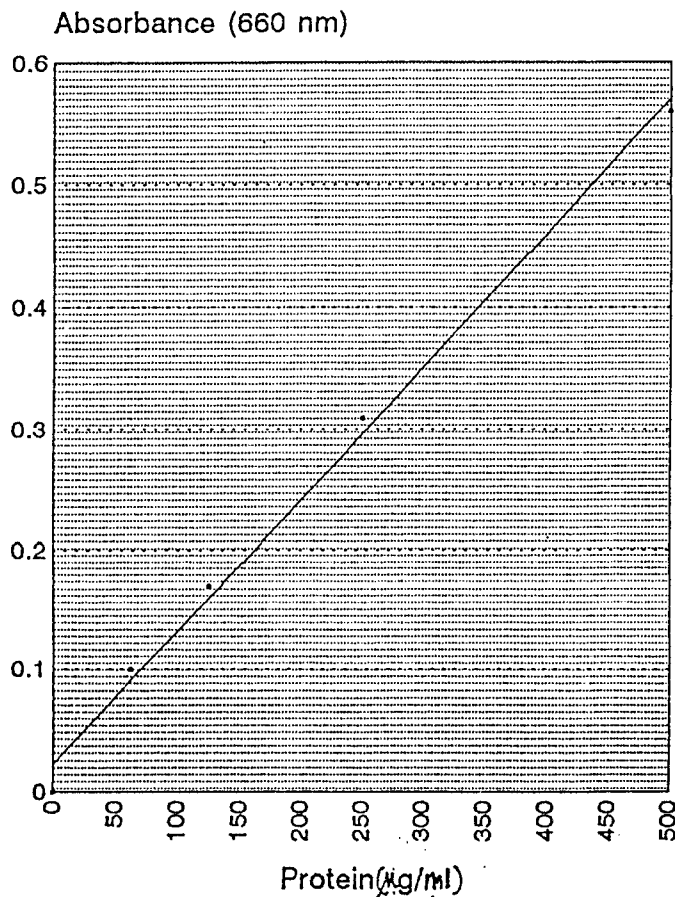
6. วัด Absorbance ที่ 750 นาโนเมตร โดยใช้ Sample buffer เป็น blank ทำตามขั้นตอน 3-6 ค่า Absorbance ที่วัดได้ไปเทียบหาความเข้มข้นของโปรตีนในหน่วยกรัมต่อลิตรจากกราฟมาตรฐานโดยนำค่าที่อ่านได้มาหารด้วย 1,000

7. เตรียม Standard curve โดยใช้ BSA ความเข้มข้นระหว่าง 50 - 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

8. สร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีน โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) เข้มข้น 62.5, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ได้ผลตามตารางที่ 14 และ รูปที่ 13

ตารางที่ 14 ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสง 660 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้นของ BSA ต่างๆกัน

ความเข้มข้น BSA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร
0.00	0.00
62.5	0.10
125	0.17
250	0.31
500	0.56



รูปที่ 13 กราฟมาตรฐานของการหาปริมาณโปรตีน (Lowry's method)

