บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท	ประเทศ
กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	Alphaphot-2 YS2	Nikon Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
แผ่นนับเม็ดเลือดแดง (Heamacytometer)	Neubauer Bright Line	Bocco Co., Ltd.	เยอรมัน
เครื่องชั่งแบบละเอียด (Electronic balance)	FX-180	A&D Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
เครื่องชั่งแบบหยาบ (Electronic balance)	FX-3000	A&D Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)	F-13	Horiba	ญี่ปุ่น
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบหมุน (Rotary incubator shaker)	G-25	New Brunswick Scientific Co., Inc.	สหรัฐอเมริกา
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบซ้ายขวา (Reciprocal incubator shaker)	HT	Infors AG	สวิตเซอร์แลนด์
เครื่องไฮเปอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography)	Shimadzu LC-6A	Shimadzu Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow hood)	NK system clean bench	International Scientific Supply	ไทย

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท	ประเทศ
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Visible Recording spectrophotometer)	KC4	Bio-tek Instruments,INC	สหรัฐอเมริกา
ตู้อบแห้ง (Oven)	UL-80	Memmert Co., Ltd.	เยอรมัน
มาตรตรวจวัดความเป็นกรดด่าง (pH combination electrode)	405-DPAS-SC-K85/225	Mettler toledo	สวิตเซอร์แลนด์
เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer)	Vortex-Genie No.2	Scientific Industries Inc.	สหรัฐอเมริกา
เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)	KT-30 SD	ALP Co., Ltd.	ญี่ปุ่น

3.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
Acetic acid ($C_2H_4O_2$)	Merck	เยอรมัน
Ammonium sulfamate ($H_6N_2O_3S$)	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์
3,5-Dinitrosalicylic acid ($C_7H_4N_2O_7$)	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์
Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	สยามซัยเคมิคอล	ไทย
Hydrochloric acid (HCl)	Merck	เยอรมัน
Iron(III) chloride anhydrous ($FeCl_3$)	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์
3-Methyl-2-benzothiazolinone hydrazone ($C_8H_{10}ClN_3S$)	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์
4-Nitrophenyl-α-D-glucopyranoside ($C_{12}H_{15}NO_8$)	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์
Sodium acetate anhydrous ($C_2H_3NaO_2$)	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
Sodium bisulfate anhydrous ($NaHSO_4$)	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์
Sodium hydroxide (NaOH)	Merck	เยอรมัน
Sodium nitrite ($NaNO_2$)	Sigma	เยอรมัน
Sodium tetraborate, 99% ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$)	Sigma	เยอรมัน
Starch from potato	Sigma	เยอรมัน
Urea $(NH_2)_2CO$	Merck	เยอรมัน
Yeast extract (สารสกัดจากยีสต์)	Difco	สหรัฐอเมริกา

3.2 จุลินทรีย์และการเตรียมกล้าเชื้อ

3.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาการผลิตกรดแลกติก คือ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 จาก Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.2 วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์

ใช้เข็มเขี่ยสปอร์ของรา *R. oryzae* NRRL 395 ลากลงบนอาหารวุ้น Potato dextrose agar หรือ PDA ประกอบด้วย มันฝรั่ง 50 กรัมต่อลิตร กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และวุ้น 18 กรัมต่อลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อทุกๆ เดือน

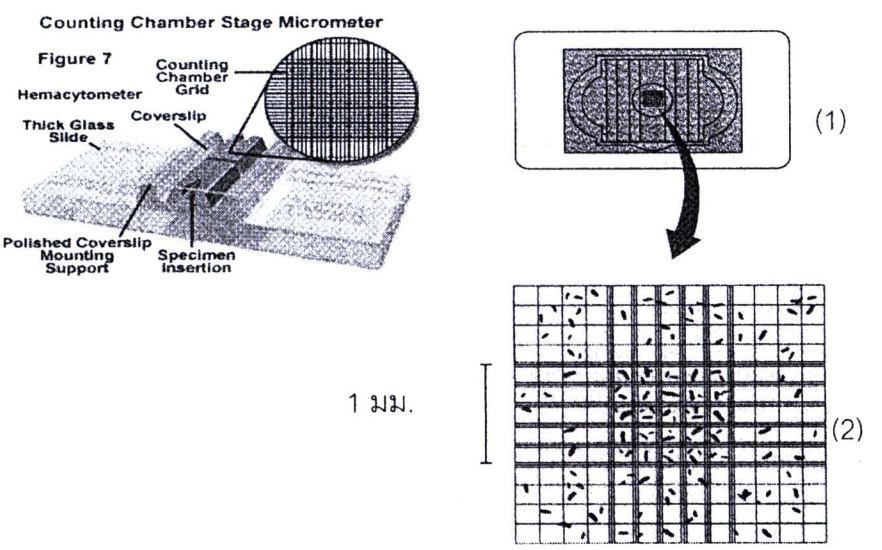
3.2.3 การเตรียมกล้าเชื้อในระยะ Conidia

เลี้ยงรา *R. oryzae* NRRL 395 บนอาหารเลี้ยงวุ้น PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 7 วัน เมื่อราเจริญเต็มที่แล้วใช้เข็มเขี่ยสปอร์ ใส่น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร เขี่ยสปอร์ให้กระจาย ปิเปตสปอร์แขวนลอยมาประมาณ 20 ไมโครลิตร ถ่ายลงบน Haemacytometer ที่ปิดด้วย Cover slip นับจำนวนสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า ตามแนวเส้น ดังรูปที่ 3.1

การคำนวณหาความเข้มข้นโดยใช้ haemacytometer

ปริมาตรใน 25 ช่องใหญ่ (400 ช่องเล็ก)	= 0.1	ลูกบาศก์มิลลิเมตร
สมมติค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์ใน 1 ช่องใหญ่	= X	เซลล์
ใน 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด	(X)x25	เซลล์
ใน 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด	(X)x25x10	เซลล์
ใน 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด	(X)x25x10x1000	เซลล์
	$= 25(X)x10^4$	

โดยนับจำนวนสปอร์ตามแนวเส้นทั้งหมด 5 ช่อง นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยเพื่อคำนวณความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอย จากนั้นเตรียมสปอร์แขวนลอยที่ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตรเทลงในอาหารเหลวสำหรับการงอกของสปอร์ปริมาตร 90 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 4 ชั่วโมง



รูปที่ 3.1 ลักษณะของ Haemacytometer (1) ภาพที่มองจากด้านบนของ chamber มีตารางอยู่กลางสไลด์ (2) ภาพขยายของตารางที่กำลังขยาย 10 เท่าประกอบด้วยสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดใหญ่แต่ละด้านยาว 1 มิลลิเมตร ภายในมีสี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็กบรรจุอยู่ 25 ช่องแต่ละช่องมีเส้น 3 เส้นล้อมรอบโดยแต่ละด้านยาว 0.2 มิลลิเมตร ภายในมีสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดเล็กบรรจุอยู่อีก 16 ช่อง

ที่มา : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, (2551)

3.3 สูตรอาหารที่ใช้ในการหมัก

3.3.1 อาหารสำหรับการงอกของสปอร์ (spore germination medium)

กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร

สารสกัดจากยีสต์ 2 กรัมต่อลิตร

3.3.2 อาหารสำหรับกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง

อาหารเลี้ยงรา *R. oryzae* NRRL 395 ที่ใช้ในงานวิจัย คือ กากมันสำปะหลัง 7.5 กรัม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที มาเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในปริมาณต่างๆ ตามที่คำนวณในภาคผนวก ข ข้อที่ 1 ในส่วนของการศึกษาแหล่งไนโตรเจน จะใช้สารละลายของสารสกัดจากยีสต์และยูเรียความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 กรัมต่อลิตร แทนน้ำกลั่น

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

ส่วนของการทดลองได้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนหลัก โดยส่วนแรกทำการศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำที่เติมเสริม ความเร็วรอบการเหวี่ยง และปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ธาตุอาหารเสริมในกระบวนการหมัก และส่วนที่ 2 ทำการศึกษาผลเชิงบวกของการเสริมเซลลูเลส (Cellulase) และกลูโคอะไมเลส (Glucomylase) ที่มีต่อจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแอล(+)แลกติกจากกากมันสำปะหลัง ดังแสดงภาวะต่างๆ ที่ศึกษาในตารางที่ 3.1 และตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 แสดงปัจจัยกายภาพและทางเคมีที่ศึกษาต่อต่อจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแอล(+)แลกติกจากกากมันสำปะหลัง

ส่วนที่ 1	เปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่เติมเสริม	ความเร็วรอบการเหวี่ยง (รอบต่อนาที)	การควบคุมค่ากรด-ด่าง	ธาตุอาหารเสริม
ชุดที่ 1.1	40, 60, 80	0	/	-
ชุดที่ 1.2		0	-	-
ชุดที่ 1.3		150	/	-
ชุดที่ 1.4		150	-	-
ชุดที่ 1.5	เลือกภาวะที่เหมาะสมที่สุดจากชุดที่ 1.1-1.4 มาใช้ศึกษา			/

ตารางที่ 3.2 แสดงภาวะในการหมักที่มีการเสริมกลูโคอะไมเลส (glucoamylase) และเซลลูเลส (cellulase) ต่อจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแอล(+)แลกติกจากกากมันสำปะหลัง

ส่วนที่ 2	เปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่เติมเสริม	ความเร็วรอบการเหวี่ยง (รอบต่อนาที)	การควบคุมค่ากรด-ด่าง	ธาตุอาหารเสริม	เอนไซม์ที่เสริม
ชุดที่ 2.1	เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดจากชุดการทดลองในส่วนที่ 1 มาใช้ศึกษา				กลูโคอะไมเลส
ชุดที่ 2.2					เซลลูเลส
ชุดที่ 2.3					กลูโคอะไมเลสร่วมกับเซลลูเลส

3.4.1 ผลของปริมาณน้ำที่เติมเสริมลงในอาหารแข็ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และรอบการเหวี่ยง

ทำการหมักในระดับขวดเขย่า โดยใส่หัวเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.3 ที่มีความเข้มข้นของสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในกากมันสำปะหลังฆ่าเชื้อ 7.5 กรัม ในข้อ 3.3.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยแปรปริมาณน้ำที่เติมเสริมลงกากมันสำปะหลัง โดยการเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในปริมาตรต่างๆโดยคิดเทียบจากน้ำหนักรวมทั้งหมดให้ได้ปริมาตรที่มีอยู่ในระบบทั้งหมดคิดเป็น 40 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเร็วรอบการเหวี่ยง 0 80 และ 150 รอบต่อนาที เลี้ยงนาน 7 วัน เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง นำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และบันทึกน้ำหนักตัวอย่างเปียก ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกส่วนใสออกจากอาหารแข็งและเส้นใยรา วัดปริมาตรส่วนใสแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส กรดแลกติก กรดฟูมาริก และเอทานอล ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) และวิเคราะห์แอคติวิตี้ของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ราสร้างขึ้น ส่วนอาหารแข็งและเส้นใยรานำไปแช่แข็งก่อนการทำระเหิดแห้งด้วยเครื่อง Freeze drier จากนั้นนำอาหารแข็งและเส้นใยราแห้งไปบันทึกน้ำหนักแห้ง ตัวอย่างแห้งนำไปวิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลือในอาหารแข็ง และปริมาณเซลล์แห้งในรูปของไคติน

3.4.2 การศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน

นำสภาวะการหมักที่ได้ผลผลิตกรดแลกติกที่มากสุดจากข้อ 3.4.1 มาทำการเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนที่เสริมเข้าไปในกระบวนการหมักระหว่าง ยูเรีย และสารสกัดจากยีสต์ โดยทำให้เป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 กรัมต่อลิตร แทนปริมาณน้ำกลั่น

จากนั้นใส่หัวเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.3 ที่มีความเข้มข้นของสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในกากมันสำปะหลังฆ่าเชื้อ 7.5 กรัม ในข้อ 3.3.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง นำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และบันทึกน้ำหนักตัวอย่างเปียก ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกส่วนใสออกจากอาหารแข็งและเส้นใยรา วัดปริมาตรส่วนใสแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส กรดแลกติก กรดฟูมาริก และเอทานอล ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) และวิเคราะห์แอคติวิตี้ของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ราสร้างขึ้น ส่วนอาหารแข็งและเส้นใยรานำไปแช่แข็งก่อนการทำระเหิดแห้งด้วยเครื่อง Freeze drier จากนั้นนำอาหารแข็งและเส้นใยราแห้งไปบันทึกน้ำหนักแห้ง ตัวอย่างแห้งนำไปวิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลือในอาหารแข็ง และปริมาณเซลล์แห้งในรูปของไคติน

3.4.3 ศึกษาผลเชิงบวกของการเสริมเซลลูเลสและกลูโคอะไมเลสในการหมักกรดแลกติกบนกากมันสำปะหลังต่อจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมัก

ศึกษาจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแลกติกบนกากมันสำปะหลังที่เสริมเซลลูเลสและกลูอะไมเลสในกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่างๆ กันในระดับขวดเขย่า ในส่วนของกลูโคอะไมเลส จะทำการเติมเอนไซม์ที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตทเพื่อกำจัดจุลินทรีย์และตะกอนต่างๆ ในปริมาตร 3.85 และ 7.70 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น พร้อมกับการใส่หัวเชื้อ ส่วนการเติมเซลลูเลสทำการเติมเอนไซม์ที่ผ่านการกรองแล้วเช่นกันในปริมาตร 45 92.5 และ 182.5 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิที่อยู่ในช่วง 50-55 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที เมื่อเริ่มต้นการหมักเติมหัวเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมโดยวิธีในข้อ 3.3.2 ที่มีความเข้มข้นของสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเซลลูเลส และอะไมเลสที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในกากมันสำปะหลังฆ่าเชื้อ 7.5 กรัม นำไปเลี้ยงในภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.4.1 หรือ 3.4.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง นำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และบันทึกน้ำหนักตัวอย่างเปียกก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกส่วนใสออกจากอาหารแข็งและเส้นใยรา วัดปริมาตรส่วนใสแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส กรดแลกติก กรดฟูมาริก และเอทานอล ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) และวิเคราะห์แอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ส่วนอาหารแข็งและเส้นใยรานำไปแช่แข็งก่อนการทำระเหิดแห้งด้วยเครื่อง Freeze drier จากนั้นนำอาหารแข็งและเส้นใยราแห้งไปบันทึกน้ำหนักแห้ง ตัวอย่างแห้งนำไปวิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลือในอาหารแข็ง และปริมาณเซลล์แห้งในรูปของไคติน

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.5 วิธีการวิเคราะห์

3.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก กรดฟูมาริก เอทานอล ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่องเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)

นำตัวอย่างส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสมาทำการเจือจางให้ความเข้มข้นเป็น 0.1 เท่า นำมากรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตทฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) เพื่อหาปริมาณกรดแลกติก กรดฟูมาริก เอทานอล และกลูโคส

คอลัมน์	Biorad Aminex HPX-87H ion exclusion organic acid column ขนาด 300 มิลลิเมตร x 7.8 มิลลิเมตร
สารละลายตัวพา	กรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0.005 mM
อุณหภูมิ	45 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	0.6 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด	RI detector (Shimadzu รุ่น RID-6A)
เวลาที่อยู่ในคอลัมน์	25 นาที

คำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแลกติก กรดฟูมาริก เอทานอล และกลูโคสที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร

3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณแอลฟา - อะไมเลส

นำตัวอย่างส่วนใส 125 ไมโครลิตร เติมลงในน้ำแป้งความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ที่ละลายอยู่ในสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 ปริมาตร125 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ในส่วนของชุดควบคุมจะใส่แค่น้ำแป้งเท่านั้น หลังจากบ่มน้ำแป้งแล้ว 30 นาที นำมาเติมสารละลาย DNSA 500 มิลลิลิตรลงไป แล้วค่อยเติมตัวอย่างส่วนใสลงไปในส่วนของชุดควบคุม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการลดอุณหภูมิให้เย็นทันที นาน 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ เข้าสู่สมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานที่แสดงในภาคผนวก ก. ข้อที่ 1 คำนวณปริมาณกลูโคสที่ได้ออกมา นำกลับไปคำนวณค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในหน่วยยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น ดังแสดงการคำนวณในภาคผนวก ข ข้อที่ 4

3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคอะไมเลส

นำตัวอย่างส่วนใส 125 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลาย 4-ไนโตรฟีนิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ที่ละลายอยู่ในสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.0 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ในส่วนของชุดควบคุมจะใส่สารละลายโซเดียมเตตระโบเรตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 575 มิลลิลิตรลงไปด้วย นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาในส่วนของชุดตัวอย่างด้วยการเติมสารละลายโซเดียมเตตระโบเรตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ เข้าสู่สมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานที่แสดงในภาคผนวก ก ข้อที่ 2 คำนวณปริมาณไนโตรฟีนอล (ρ-nitrophenol) ที่ได้ออกมา เพื่อนำกลับไปคำนวณค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น ดังแสดงการคำนวณในภาคผนวก ข ข้อที่ 5

3.5.4 การวิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ในกากมันสำปะหลัง

นำสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ 9 มิลลิลิตรใส่ลงกากมันแห้ง 1 กรัม นำไปย่อยที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 60 นาทีด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ทำให้เย็นลง แล้วนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อแยกส่วนของแข็งออกจากของเหลว นำส่วนของเหลวที่ได้ไปทำการเจือจาง 10 เท่า วัดปริมาณกลูโคสที่ได้ด้วยเครื่องมือ YSI แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณให้อยู่ในหน่วย มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น ดังแสดงการคำนวณในภาคผนวก ข ข้อที่ 3

3.5.5 การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ทางอ้อม

โดยใช้วิธีการวิเคราะห์กลูโคซามีนซึ่งเป็นหน่วยย่อยของไคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของราเป็นตัวแทนในการบ่งชี้ปริมาณเซลล์แห้ง ขั้นตอนในการวิเคราะห์ แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

3.5.5.1 การสกัดเอาไคตินออกจากผนังเซลล์ของรา

นำสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 10 โมลาร์ 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในกากมันแห้งหนัก 0.1 กรัม ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที จากนั้นนำมาเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการไล่ออกซิเจนโดยใช้ก๊าซไนโตรเจนประมาณ 1 นาที นำไปย่อยที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอ เพื่อให้ได้ส่วนที่เป็นไคตินออกมา ทำให้เย็นลงถึงอุณหภูมิห้องด้วยน้ำประปา

3.5.5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีน

นำส่วนสารละลายไคตินที่ได้จากข้อ 3.5.5.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในช่วง 5.0 ถึง 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียวไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 โมลาร์ ปรับปริมาตรจนได้ 10 มิลลิลิตร ดูดสารละลายเจือจางไคตินมา 0.5 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลายต่างๆ ตามภาคผนวก ก ข้อที่ 3 โดยจะทำการเติมสารละลายโซเดียมไนเตรต 0.5 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลายโซเดียมไบซัลเฟต 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยนำไปไว้ที่ตู้บ่มใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวียงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ดูดตัวอย่างที่ได้มา 0.6 มิลลิลิตร นำมาเติมสารละลายแอมโมเนียมซัลฟาเมตลงไป แล้วนำไปไว้ในตู้บ่มใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นน้ำมาเติมสารละลาย 3-เมทิล-2-เบนโซไทโซลิโนน ไฮดราโซนท ไฮโดรคลอไรด์ (MBTH) 0.2 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ทำให้เย็นลง แล้วเติมสารละลายเฟอริคคลอไรด์ 0.2 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที นำส่วนของเหลวไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน ที่แสดงในภาคผนวก ก ข้อที่ 3 เพื่อคำนวณเป็นปริมาณกลูโคซามีน ออกมา ดังแสดงในภาคผนวก ข ข้อที่ 6