อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. แหล่งของเชื้อจุลินทรีย์

1.1 จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย

เชื้อ *Bacillus subtilis* GN156 (KUB-H 004 หรือ BCC 6079) เป็นเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างข้าวโพดหมัก 70 วัน ฟาร์มโชคชัย (ทองเลียน, 2541)

1.2 แบคทีเรียกรดแลกติก

เชื้อ *Lactobacillus pentosus* ST10-1 เป็นแบคทีเรียกรดแลกติกชนิด Homofermentative มีลักษณะเป็นแท่ง และติดสีแกรมบวก เป็นเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างดิน ฟาร์มโคนม อ.เมือง จ.นครปฐม (อำนาจ, 2540)

2. แหล่งของพืชอาหารสัตว์ที่ใช้ทดลอง

หญ้าเนเปียร์สด *(Pennisetum purpureum)* ที่มีอายุในการเพาะปลูก 60 วัน ความชื้น 68-72 เปอร์เซ็นต์ ปลูก ณ แปลงทดลอง อ.เมือง จ.ปทุมธานี

วิธีการทดลอง

1. การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายจากเชื้อ *Bacillus subtilis* GN156

ย้ายเชื้อ *B. subtilis* GN156 ที่มีอายุ 18-24 ชั่วโมงจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 1 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (shaking incubator) ของ New Brunswick Sciencetific Co., Inc. อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นย้ายลงในอาหารเหลว

ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาณเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มต่อในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ และความเร็วรอบเดิม เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมงย้ายเชื้ออีกครั้งโดยใช้ปริมาณเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM ปริมาตร 250 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร 2 ขวด บ่มต่อในตู้บ่มเชื้อตามสภาวะข้างต้น จากนั้นเก็บตัวอย่างครั้งละ 8 มิลลิลิตรทุก 2 ชั่วโมงตั้งแต่เวลา 0-14 ชั่วโมง 18 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ และปริมาณเชื้อโดยวิธีในหัวข้อ 4.1

ในกรณีที่ใช้ซีเอ็ม-เซลลูโลส เพคติน หรือไซแลนเป็นสารเหนี่ยวนำ เติมสารเหนี่ยวนำความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เฉพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM ปริมาตร 250 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตรทั้ง 2 ขวดก่อนการย้ายเชื้อ

ในกรณีของการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร DXM ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร DXM แทนการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM ในทุกครั้งของการย้ายเชื้อ และในกรณีของการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายจากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร NB ที่มีไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์เป็นสารเหนี่ยวนำใช้วิธีการของ Kiatgrajai *et al.* (2005)

2. <u>การเตรียมเอนไซม์ย่อยสลายเข้มข้นจากเชื้อ *Bacillus subtilis* GN156 โดยวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 30-90 เปอร์เซ็นต์</u>

ดำเนินการโดยดัดแปลงวิธีของ Rosenberg (1996) โดยเหวี่ยงแยกสารละลายเอนไซม์ออกจากเซลล์ด้วยเครื่องเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Sigma) ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแช่บีกเกอร์ที่มีสารละลายเอนไซม์ 50 มิลลิลิตรในถาดน้ำแข็งเพื่อรักษาอุณหภูมิตลอดการตกตะกอนที่ 4 องศาเซลเซียส ค่อย ๆ เติมแอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณที่ทำให้สารละลายในบีกเกอร์เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ตามตารางในภาคผนวก ก. คนให้เข้ากันโดยระวังไม่ให้เกิดฟอง จากนั้นแช่บีกเกอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง ทำการเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากของเหลวด้วยเครื่องเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนที่ได้ด้วย citrate phosphate buffer pH 5.5 จำนวน 5 มิลลิลิตร ทำการตกตะกอนด้วยวิธีข้างต้นซ้ำโดยเปลี่ยนความเข้มข้นของแอมโมเนียซัลเฟตเป็น 40 50 60 70 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์ วัดปริมาณโปรตีนที่ได้ด้วยวิธีของ Lowry (Lowry *et al*.,1951)

3. <u>การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลาย</u>

3.1 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ซีเอ็ม-เซลลูเลส

กิจกรรมของเอนไซม์ซีเอ็ม-เซลลูเลสวัดจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยซีเอ็ม-เซลลูโลส โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Sa´-Pereira (2002) คือ บ่มสารละลายซีเอ็ม-เซลลูโลส (Sigma) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน citrate phosphate buffer pH 5.5 ที่ใช้เป็นสับสเทรตกับตัวอย่างที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หยุดการทำงานของเอนไซม์ด้วยสารละลายดีเอ็นเอส วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (Bio Aquariust 7250) ที่ค่าความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ทุกตัวอย่างทำชุดควบคุมโดยเติมสารละลายดีเอ็นเอสก่อนเติมสับสเทรต และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์จากกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ซีเอ็ม-เซลลูเลสหมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยซีเอ็ม-เซลลูโลสได้น้ำตาลรีดิวซ์ 1 นาโนโมล ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เพคติเนส

กิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนสวัดจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยเพคติน โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Sa´-Pereira (2002) คือบ่มสารละลายเพคติน (Pectin from apple pomace, Sigma) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ใน citrate phosphate buffer pH 5.5 ที่ใช้เป็นสับสเทรตกับตัวอย่างที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หยุดการทำงานของเอนไซม์ด้วยสารละลายดีเอ็นเอส วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ค่าความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ทุกตัวอย่างทำชุดควบคุมโดยเติมสารละลายดีเอ็นเอสก่อนเติมสับสเทรต และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์จากกราฟมาตรฐานน้ำตาลกาแลกโตส

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์เพคติเนสหมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยเพคตินได้น้ำตาลรีดิวซ์ 1 นาโนโมล ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

3.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส

กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสวัดจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยเพคติน โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Sa´-Pereira (2002) คือบ่มสารละลายไซแลน (Oat spelt xylan, Sigma) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ใน citrate phosphate buffer pH 5.5 ที่ใช้เป็นสับสเทรตกับตัวอย่างที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หยุดการทำงานของเอนไซม์ด้วยสารละลายดีเอ็นเอส วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ค่าความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ทุกตัวอย่างทำชุดควบคุมโดยเติมสารละลายดีเอ็นเอสก่อนเติมสับสเทรต และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์จากกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ไซลาเนสหมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยไซแลนได้น้ำตาลรีดิวซ์ 1 นาโนโมล ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

3.4 การวิเคราะห์กิจกรรมเบตา-กลูคาเนส

กิจกรรมของเอนไซม์เบตา-กลูคาเนสวัดจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยเบตา-กลูแคนโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Sa´-Pereira (2002) คือ บ่มสารละลายเบตา-กลูแคน (Barley beta-glucan, Sigma) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ใน citrate phosphate buffer pH 5.5 ที่ใช้เป็นสับสเทรตกับตัวอย่างที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หยุดการทำงานของเอนไซม์ด้วยสารละลายดีเอ็นเอส วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ค่าความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ทุกตัวอย่างทำชุดควบคุมโดยเติมสารละลายดีเอ็นเอสก่อนเติมสับสเทรต และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์จากกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์เบตา-กลูคาเนสหมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยเบตา-กลูแคนได้น้ำตาลรีดิวซ์ 1 นาโนโมล ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

3.5 การวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์

การวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรตในหญ้าทำได้โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Sa´-Pereira (2002) คือบ่มสารละลายหญ้าเนเปียร์บดแห้งที่เตรียมโดยการ

อบหญ้าเนเปียร์ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 2 วัน บดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตรด้วยเครื่อง CyclotecTM 1093 Mill (Foss, Denmark) และผสมใน citrate phosphate buffer pH 5.5 ให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์กับตัวอย่างที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หยุดการทำงานของเอนไซม์ด้วยสารละลายดีเอ็นเอส วัดค่าการดูดกลืนแสงเฉพาะส่วนของเหลวด้วยเครื่อง spectro photometer ที่ค่าความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ทุกตัวอย่างทำชุดควบคุมโดยเติมสารละลายดีเอ็นเอสก่อนเติมสับสเทรต และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์จากกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ย่อยสลายที่ย่อยหญ้าเนเปียร์บดแห้งได้น้ำตาลรีดิวซ์ 1 นาโนโมล ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

4. <u>การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์</u>

4.1 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *Bacillus subtilis* GN 156

เจือจางตัวอย่างให้ได้ปริมาณเชื้อที่เหมาะสมด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ฆ่าเชื้อแล้วก่อนใช้เทคนิค spread plate บนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นเมื่อครบ 18 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Cho *et al*., 2003)

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก

เจือจางตัวอย่างให้ได้ปริมาณเชื้อที่เหมาะสมด้วยสารละลาย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ใช้เทคนิค pour plate ด้วยอาหารแข็ง MRS (De Man, Rogosa and sharpe, Merck) ที่เติม $CaCO_3$ 0.6 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และนับจำนวนโคโลนีที่เกิดบริเวณใส (clear zone) เมื่อครบ 24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Gonza´lez and Rodrı´guez, 2003)

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อกลุ่ม Enterobacteria

เจือจางตัวอย่างให้ได้ปริมาณเชื้อที่เหมาะสมด้วยสารละลาย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ใช้เทคนิค pour plate ด้วยอาหาร VRB (Violet red bile agar with lactose, Britania)

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และนับจำนวนโคโลนีที่มีสีม่วงแดงเมื่อครบ 24 ชั่วโมง (Kung *et al.*, 2000)

4.4 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อรา และยีสต์

เจือจางตัวอย่างให้ได้ปริมาณเชื้อที่เหมาะสมด้วยสารละลาย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ใช้เทคนิค pour plate ด้วยอาหาร PDA (Potato dextrose agar, Merck) ที่เติมกรดทาร์ทาริก 10 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และนับจำนวนโคโลนีของตัวอย่างเมื่อครบ 3 วัน (ดัดแปลงจากGonza´ lez and Rodri´guez, 2003)

4.5 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อกลุ่ม Clostridia

เจือจางตัวอย่างให้ได้ปริมาณเชื้อที่เหมาะสมด้วยสารละลาย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ใช้เทคนิค pour plate ด้วยอาหาร Sulphite iron agar (Himedia) จากนั้นเททับด้วย agar 1.4 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และนับจำนวนโคโลนีที่มีสีดำเมื่อครบ 24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Jong *et al*., 2003)

5. <u>การผลิตไซเลจ</u>

5.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก *L. pentosus* ST10-1

ย้ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก *L. pentosus* ST10-1 จาก stock ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้อ (incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาณเชื้อ และสภาวะการเลี้ยงเชื้อข้างต้นเป็นเวลา 9 ชั่วโมง ทำการเจือจางให้ได้ปริมาณเชื้อ 6 log CFU ต่อกรัมหญ้าเนเปียร์

5.2 การเตรียมเอนไซม์ย่อยสลายจากเชื้อ *Bacillus subtilis* GN156

เตรียมเอนไซม์ย่อยสลายด้วยวิธีดังแสดงในหัวข้อ 1 ทำการเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม

5.3 การหมักไซเลจ

ตัดหญ้าเนเปียร์อายุ 60 วัน ที่ความสูงจากพื้นดิน 5 นิ้ว หั่นเป็นชิ้นขนาด 1.5-2.0 เซนติเมตร ผึ่งทิ้งไว้ประมาณ 25-29 ชั่วโมง และพลิกกลับเป็นระยะ ๆ จนมีความชื้นอยู่ในช่วง 78-82 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นบรรจุลงในถุงโพลีโพพิลีนที่อากาศผ่านเข้าไม่ได้ขนาด 7 x 9.5 นิ้ว ถุงละ 50 กรัม เติมหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก และเอนไซม์ย่อยสลายอย่างละ 1 มิลลิลิตร (ชุดการทดลอง) หรือหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก และน้ำกลั่นอย่างละ 1 มิลลิลิตร (ชุดควบคุม) ในกรณีที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารเสริมร่วมจะเติมน้ำกลูโคส 1 กรัมทั้งในชุดการทดลอง และชุดควบคุม ทุกชุดการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ หลังจากนั้นผสมให้เข้ากัน บีบอัดให้แน่นด้วยเครื่องบีบอัดดังภาพผนวกที่ ก11 และปิดผนึกถุงด้วยเครื่องปิดผนึกสูญญากาศ เก็บตัวอย่างไซเลจทุกวันที่ 0 1 3 10 21 60 และ 3 วันหลังจากการเปิดถุงหมักในวันที่ 60 แล้วเก็บตัวอย่างไซเลจเพื่อวิเคราะห์คุณภาพ

6. <u>การวิเคราะห์คุณภาพไซเลจ</u>

6.1 การตรวจวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

สุ่มตัวอย่างไซเลจ 10 กรัม ใส่ในถุง Stomacher ขนาด 152 x 101 มิลลิเมตรด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เทสารละลาย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในถุง ตีปั่นด้วยเครื่อง Stomacher Lab Blender ความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที วิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก จุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria จุลินทรีย์กลุ่ม Clostridia เชื้อยีสต์ และราจากตัวอย่างที่ได้ด้วยวิธีในหัวข้อ 4

6.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต

สุ่มตัวอย่างไซเลจ 10 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 เก็บตัวอย่างของเหลวไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอวิเคราะห์ต่อไป (Ohmomo *et al*., 2004)

6.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar)

ดำเนินการตามวิธีของ Miller (1959) โดยเตรียมสารผสมตัวอย่าง 0.25 มิลลิลิตร และสารละลายดีเอ็นเอส จำนวน 0.25 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แช่น้ำเย็น 5 นาที และเจือจางด้วยน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

6.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ

วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำโดยวิธี phenol-sulfuric (Dubois *et al*., 1956) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณน้ำตาลคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

6.2.3 การวิเคราะห์น้ำตาลด้วยวิธีโครมาโทรกราฟีแบบแผ่นบาง

การวิเคราะห์น้ำตาลด้วยวิธีโครมาโทรกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin-layer chromatography, TLC) เป็นวิธีการระบุชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่ และโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์ R_F ของจุดที่ปรากฏบนแผ่น TLC เทียบกับค่าเปอร์เซ็นต์ R_F ของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลแต่ละชนิด

ก. การวิเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ด้วยวิธี TLC

ดำเนินการโดยดัดแปลงจากวิธีของ Apiraksakorn (2006) โดยใช้ถัง TLC (TLC tank) ขนาด 27.5 x 7.5 x 27.5 เซนติเมตรที่มี mobile phase ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นบิวทานอล ไอโซโพรพานอล เอธานอล และน้ำกลั่นอัตราส่วน 2: 3: 3: 2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้อิ่มตัวเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หยดสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส เซลโลไบโอส เซลโลไตรโอส (cellotriose) เซลโลเตตราโอส (cellotetraose) และเซลโลเพนตาโอส (cellopentaose) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หรือตัวอย่างที่เตรียมจากการกรองของเหลวที่เก็บไว้ด้วยเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอนแล้วทำให้เข้มข้นขึ้น 5 เท่า ปริมาตร 3 ไมโครลิตร บนแผ่น TLC ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร (Kieselgel 60, Merck) จากนั้นใส่แผ่น TLC ลงใน chamber ทิ้งไว้จน mobile phase เคลื่อนที่บนแผ่น TLC จนได้ระยะทางที่ต้องการ ทำการตรวจสอบผลโดยการย้อมแผ่น TLC ด้วยสารละลาย orcinol ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ในกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 1 นาที เมื่ออบแผ่น TLC ในตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาทีจุดของโอลิโกแซคคาไรด์จะปรากฏสีม่วง (Nalumpang *et al*., 2002)

ข. การวิเคราะห์น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และโมเลกุลคู่ด้วยวิธี TLC

ทำการทดลองเหมือนในข้อ ก. โดยใช้สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส กาแลกโตส มอลโตส แลกโตส ฟรุกโตส ซูโครส อาราบิโนส แมนโนส ไซโลส ไรโบส และเซลโลไบโอสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์แทนสารละลายมาตรฐานโอลิโกแซคคาไรด์ ใช้สารละลายสูตร A-E เป็น mobile phase แทนสารละลายเดิม (ตารางผนวกที่ ก2) และทำให้ตัวอย่างหญ้าเนเปียร์สดและตัวอย่างไซเลจเข้มข้น 20 เท่า และ 10 เท่าตามลำดับ

6.3 การตรวจวิเคราะห์ทางเคมี

6.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณวัตถุแห้ง

ปริมาณวัตถุแห้ง (Dry matter, DM) หาได้จากการอบตัวอย่างไซเลจ 10 กรัม ในตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักตัวอย่างหลังการอบเพื่อคำนวณหาปริมาณวัตถุแห้ง (ดัดแปลงจาก AOAC, 1990)

6.3.2 การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง

วัดค่าความเป็นกรดด่างจากตัวอย่างที่เตรียมจากหัวข้อ 6.2 ด้วยเครื่อง pH meter (Sartorius, Germany) (ดัดแปลงจาก AOAC, 1990)

6.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรด

วิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก กรดอะซิติก กรดโปรปีโอนิก และกรดบิวทีริก จากตัวอย่างที่เตรียมในหัวข้อ 6.2 และผ่านการกรองด้วยหัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Orange) ด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์ Rezex ROA-organic acid H^+ (Phenomenex) ขนาด 300 x 78 มิลลิเมตรที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และใช้สารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.005 N เป็น mobile phase ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

6.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน (Ammonia nitrogen)

วิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธีของ Weatherburn (1967) และเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตรกับกราฟมาตรฐานสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต

7. <u>สถานที่ทำการทดลอง</u>

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. <u>ระยะเวลาในการทดลอง</u>

การทดลองเริ่มตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2546 และสิ้นสุดเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2549

9. <u>แหล่งเงินทุนสนับสนุน</u>

ทุนพัฒนาบุคลากรระดับปริญญาโท-เอกจากศูนย์พันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ระหว่างเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2546 ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2548