ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NB

Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม

สูตรนี้ใช้เตรียมอาหารปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 6.8

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร DXM (Sa'-Pereira *et al*., 2000)

K_2HPO_4	1.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
Soybean flour	2.0	กรัม
Oat spelts xylan	10.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
$CaCO_3$	2.0	กรัม

สูตรนี้ใช้เตรียมอาหารปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 6.8

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM (Tang *et al*.,2004)

Dextrin	20.0	กรัม
Yeast extract	20.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
KH_2PO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4 .7H_2O$	0.1	กรัม
$CaCl_2$	0.1	กรัม

สูตรนี้ใช้เตรียมอาหารปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 6.8

2. <u>การเตรียมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่าง ๆ สำหรับตกตะกอนเอนไซม์ย่อยสลาย</u>

เตรียมโดยชั่งแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับปริมาณที่แสดงผลในตารางผนวกที่ ก1

<u>ตารางผนวกที่ ก1</u> ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม) ที่ใช้ในการตกตะกอนตัวอย่างปริมาตร 1 ลิตร

From S_1% ↘ To S_2% →	5	10	15	20	25	30	35	40	45
0	27	55	84	113	144	176	208	242	277
5		27	56	85	115	146	179	212	246
10			28	57	86	117	149	182	216
15				28	58	88	119	151	185
20					29	59	89	121	154
25						29	60	91	123
30							30	61	92
35								30	62
40									31
45									
50									

From S_1%	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5	282	319	357	397	439	481	526	572	621	671	723
10	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15	219	255	292	331	371	413	456	501	548	596	647
20	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25	157	191	227	265	304	344	386	429	475	522	571
30	126	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45	31	64	97	132	169	206	245	286	329	373	419
50		32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
55			33	66	101	138	175	215	256	298	343
60				33	67	103	140	179	219	261	305
65					34	69	105	143	183	224	266
70						34	70	107	146	186	228
75							35	72	110	149	190
80								36	73	112	152
85									37	75	114
90										37	76
95											38

<u>หมายเหตุ</u> S_1 คือความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอน (เปอร์เซ็นต์)

S_2 คือความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ต้องการในการตกตะกอน (เปอร์เซ็นต์)

ที่มา: Scope (1988)

3. <u>การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์ย่อยสลายเข้มข้น</u>

วิเคราะห์โดยใช้วิธีของ Lowry (Lowry *et al*., 1951)

3.1 สารเคมี

3.1.1 สารละลาย A

สารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.1 N

3.1.2 สารละลาย B

สารละลาย $CuSO_4.5H_2O$ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ผสมกับสารละลาย Na-K tartrate ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1

3.1.3 สารละลาย Folin-ciocalteua phenol ความเข้มข้น 1 N

3.1.4 สารละลายมาตรฐานโปรตีน Bovine serine albumin (บีเอสเอ)

สารละลายบีเอสเอความเข้มข้น 0.0625 0.125 0.250 0.500 1.000 และ 2.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

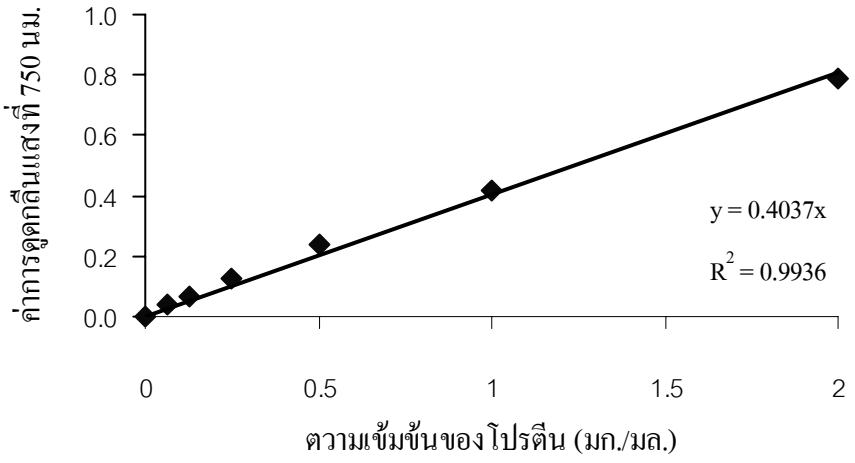
3.2 วิธีการทดลอง

ใส่ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรในหลอดทดลองขนาด 15 x 160 มิลลิเมตร เติมสารละลาย A และ B ซึ่งผสมในอัตราส่วน 50 ต่อ 1 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteau phenol 0.3 มิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 นาโน

เมตร นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายบีเอสเอเพื่อหาปริมาณโปรตีน ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างในกรณีของ blank

3.3 กราฟมาตรฐานปริมาณโปรตีน

ใช้สารละลายมาตรฐานโปรตีนความเข้มข้นต่าง ๆ แทนตัวอย่างตามวิธีในข้อ 3.2 เขียนกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของโปรตีนโดยให้แกนตั้งเป็นค่าการดูดกลืนแสง และแกนนอนเป็นความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโปรตีน



ภาพผนวกที่ ก1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของโปรตีน

4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลาย

วิเคราะห์โดยใช้วิธีของ Miller (Miller, 1959)

4.1 สารเคมี

4.1.1 สารละลาย 3, 5- Dinitrosalicylic acid (ดีเอ็นเอส)

ละลายดีเอ็นเอส 10 กรัม ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 N ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เติม Na-K tartrate 300 กรัมที่อุณหภูมิสูง จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

4.1.2 สารละลาย citrate phosphate buffer pH 5.5

ผสมสารละลาย citric acid ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 216 มิลลิลิตรกับสารละลาย $Na_2HPO_4.7H_2O$ ความเข้มข้น 0.2 M ปริมาตร 284 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

4.1.3 สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส และไซโลส

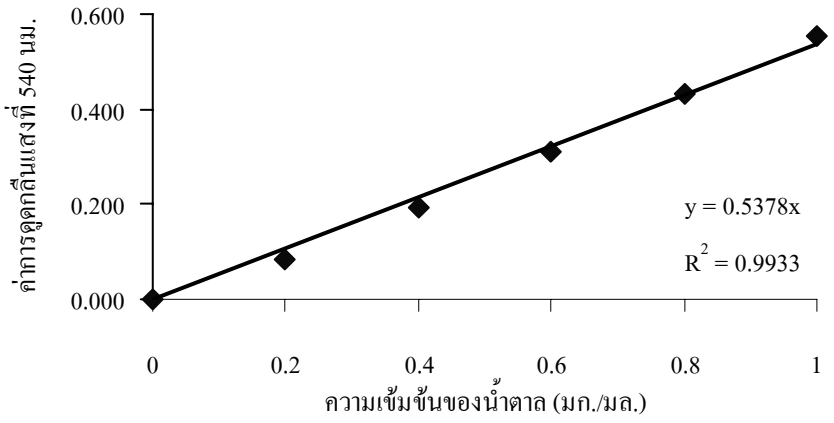
สารละลายน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส และไซโลสความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2 วิธีการทดลอง

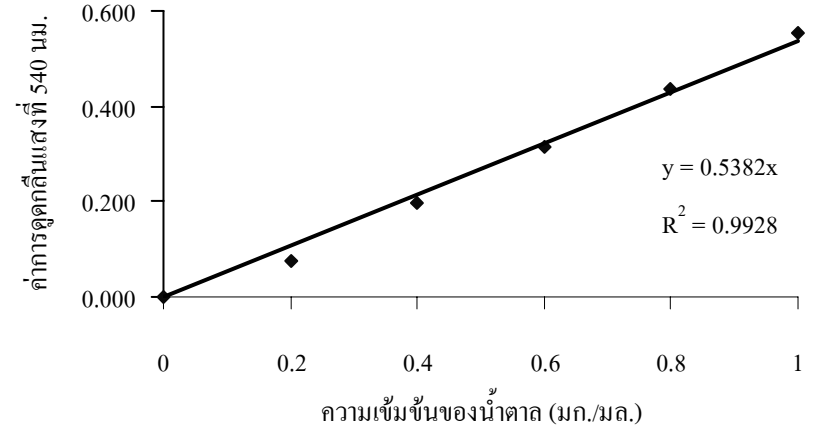
บ่มตัวอย่าง 0.25 มิลลิลิตร ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นผสมให้เข้ากับสารละลายที่ใช้เป็นสับสเทรตใน citrate phosphate buffer pH 5.5 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิเดิม 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายดีเอ็นเอสจำนวน 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แช่น้ำเย็น 5 นาที แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องspectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลเพื่อคำนวณหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ ทุกตัวอย่างทำชุดควบคุมโดยเติมสารละลายดีเอ็นเอสก่อนเติมสับสเทรต และ blank ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างและสับสเทรต

4.3 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาล

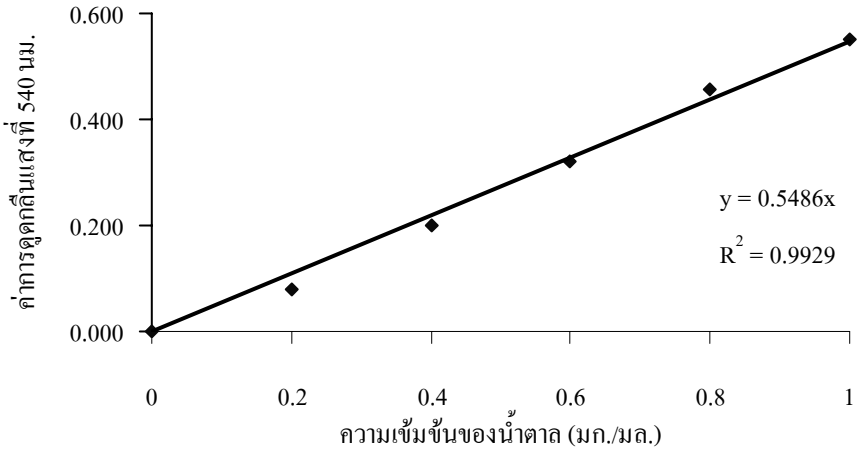
ใช้สารละลายมาตรฐานน้ำตาลความเข้มข้นต่าง ๆ แทนตัวอย่างตามวิธีในข้อ 4.2 เขียนกราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลให้แกนตั้งเป็นค่าการดูดกลืนแสง และแกนนอนเป็นความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาล



ภาพผนวกที่ ก2 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลกลูโคส



ภาพผนวกที่ ก3 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลกาแลกโตส



ภาพผนวกที่ ก4 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลไซโลส

5. <u>การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ</u>

วิเคราะห์โดยใช้วิธี phenol-sulfuric ของ Dubois *et al* (1956)

5.1 สารเคมี

5.1.1 สารละลาย phenol ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร

5.1.2 สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น

5.1.3 สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

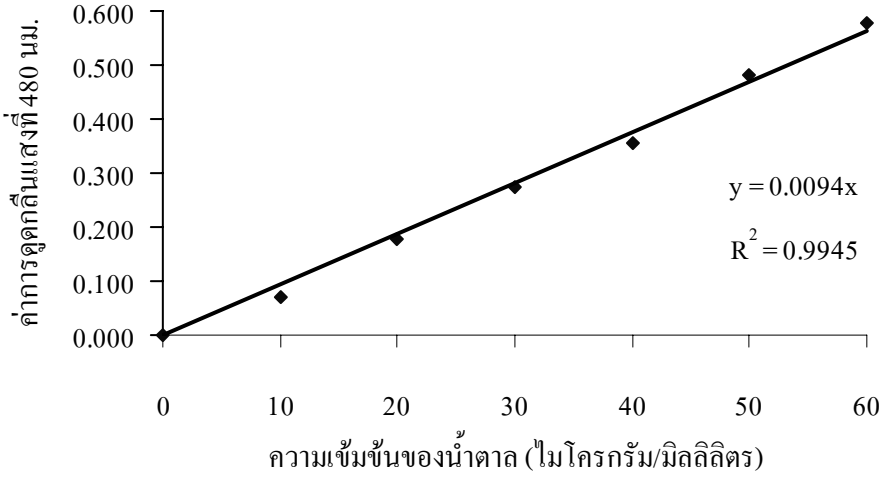
สารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 10 20 30 40 50 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.2 วิธีการทดลอง

ใส่ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในหลอดทดลองขนาด 15 x 160 มิลลิเมตร ผสมให้เข้ากับสารละลาย phenol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และทิ้งไว้ 10 นาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส 20 นาที จึงวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลกลูโคสเพื่อคำนวณหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำของตัวอย่าง ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างในกรณีของ blank

5.3 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลกลูโคส

ใช้สารละลายมาตรฐานน้ำตาลความเข้มข้นต่าง ๆ แทนตัวอย่างตามวิธีในข้อ 5.2 เขียนกราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลกลูโคสให้แกนตั้งเป็นค่าการดูดกลืนแสง และแกนนอนเป็นความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลกลูโคส



ภาพผนวกที่ ก5 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ WSC

6. การวิเคราะห์น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และโมเลกุลคู่ด้วยวิธีโครมาโทรกราฟีแบบแผ่นบาง

6.1 สูตรของสารละลายที่ใช้เป็น mobile phase

เตรียมสารละลายตามสูตรในตารางผนวกที่ ก2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรเพื่อใช้เป็น mobile phase

ตารางผนวกที่ ก2 สารละลายที่ใช้เป็น mobile phase ในการวิเคราะห์น้ำตาลด้วยวิธี TLC สูตรต่าง ๆ

สูตรของสารละลาย	สารองค์ประกอบ	อัตราส่วน	ที่มา
A	อะซิโตน: บิวทานอล: น้ำกลั่น	5: 4: 1	Ghebregzabher *et al*.
B	อะซิโตน: ไอโซโพรพานอล: กรดแลกติก 0.1 M	4: 4: 2	(1976)
C	อะซิโตน: บิวทานอล: น้ำกลั่น	7: 1.5: 1.5	
D	บิวทานอล: เอธานอล: น้ำกลั่น	5: 2.5: 2.5	Ovodov *et al.* (1967)
E	อะซิโตน: คลอโรฟอร์ม: บิวทานอล: น้ำกลั่น	7.62: 0.95: 0.95: 0.48	Lato *et al*. (1969)

6.2 ค่า R_F ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และโมเลกุลคู่

ค่า R_F ของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC เมื่อใช้สารละลายสูตรต่าง ๆ เป็น mobile phase แสดงในตารางผนวกที่ ก3

ตารางผนวกที่ ก3 ค่า R_F ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และคู่ชนิดต่าง ๆ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC เมื่อใช้สารละลายสูตรต่าง ๆ เป็น mobile phase

น้ำตาล	ค่าเปอร์เซ็นต์ R_F				
	A	B	C	D	E
เซลโลไบโอส	30	78	39	38	28
กาแลคโตส	38	73	46	43	39
กลูโคส	45	77	55	47	47
แมนโนส	49	80	58	51	51
อาราบิโนส	50	77	61	48	55
ไซโลส	60	84	70	56	67

7. การวิเคราะห์ปริมาณกรดในตัวอย่างไซเลจ

7.1 สารเคมี

7.1.1 สารละลายกรด tartaric ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์

เตรียมด้วยน้ำ deionize และกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตรก่อนใช้

7.1.2 สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.05 N

เตรียมด้วยน้ำ deionize กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร และดูดอากาศออกด้วย pump จนไม่มีฟองอากาศผสมอยู่ก่อนใช้

7.1.3 สารละลายมาตรฐานกรดผสม

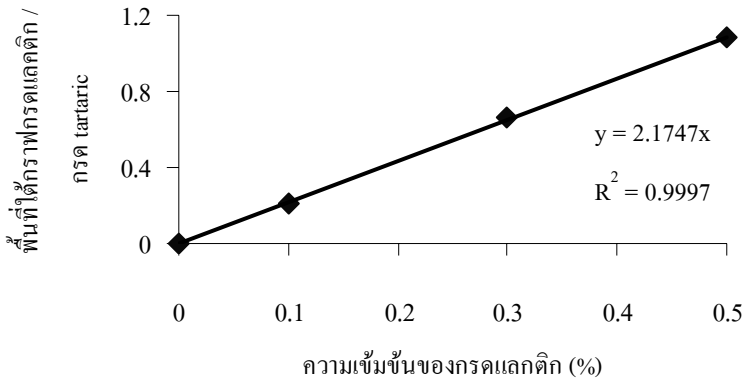
สารละลายกรดแลกติก อะซิติก โปรปิโอนิก และบิวทีริกความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เตรียมด้วยน้ำ deionize และกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตรก่อนใช้

7.2 วิธีการทดลอง

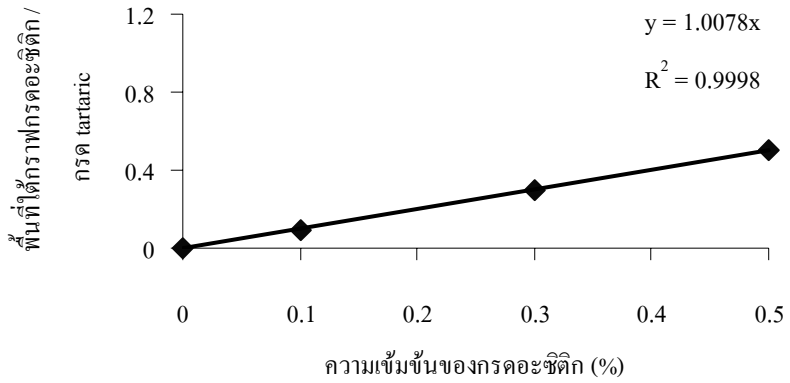
กรองตัวอย่างผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตรก่อนผสมกับสารละลายกรด tartaric ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ฉีดตัวอย่างเข้าสู่เครื่อง HPLC ที่ใช้สารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.05 N เป็น mobile phase เครื่องจะใช้เวลาวิเคราะห์กรดในตัวอย่างนาน 35 นาที จากนั้นนำค่าพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ของกรดแต่ละชนิดในตัวอย่างหารด้วยค่าพื้นที่ใต้กราฟของกรด tartaric ในตัวอย่างนั้นคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแต่ละชนิดเพื่อหาปริมาณกรดแต่ละชนิดในตัวอย่างต่อไป

7.3 กราฟมาตรฐานกรด

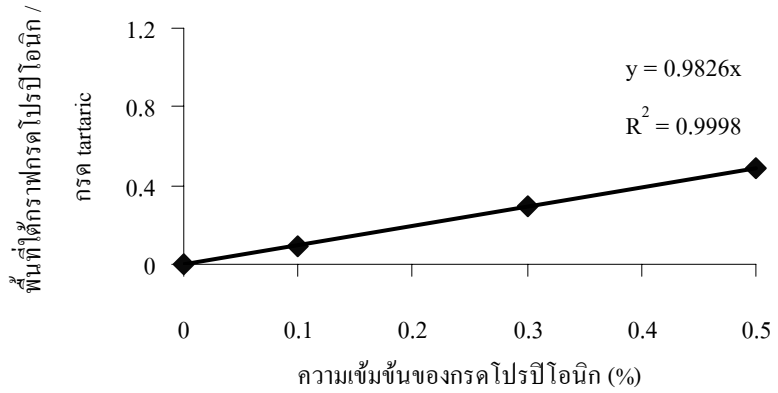
ผสมสารละลายมาตรฐานกรดผสมทั้ง 3 ความเข้มข้นกับกรด tartaric ด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อทำการวิเคราะห์ จากนั้นนำค่าพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ของกรดแต่ละชนิดในสารละลายมาตรฐานกรดผสมแต่ละความเข้มข้นหารด้วยค่าพื้นที่ใต้กราฟของกรด tartaric ในสารละลายมาตรฐาน แล้วเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าพื้นที่ใต้กราฟของกรดแต่ละชนิดที่หารด้วยพื้นที่ใช้กราฟของกรด tartaric แล้วกับความเข้มข้นของกรดชนิดนั้น



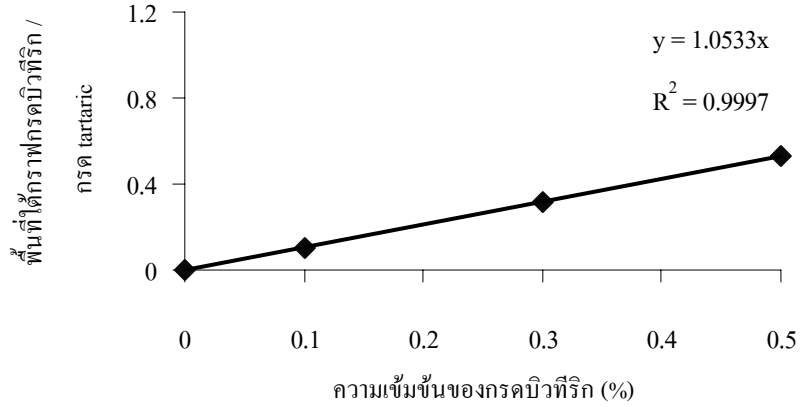
ภาพผนวกที่ ก6 กราฟมาตรฐานกรดแลกติก



ภาพผนวกที่ ก7 กราฟมาตรฐานกรดอะซิติก



ภาพผนวกที่ ก8 กราฟมาตรฐานโปรปิโอนิก



ภาพผนวกที่ ก9 กราฟมาตรฐานกรดบิวทีริก

8. <u>การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนในตัวอย่างไซเลจ</u>

วิเคราะห์โดยใช้วิธีของ Weatherburn (1967)

8.1 สารเคมี

8.1.1 สารละลาย A

ผสม phenol 5 กรัมกับ sodium nitroprusside 25 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ deionize ให้ได้ 500 มิลลิลิตร

8.1.2 สารละลาย B

ผสม NaOH 2.5 กรัมกับ sodium hypochlorite 4.2 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ deionize ให้ได้ 500 มิลลิลิตร

8.1.3 สารละลายมาตรฐานแอมโมเนียมซัลเฟต

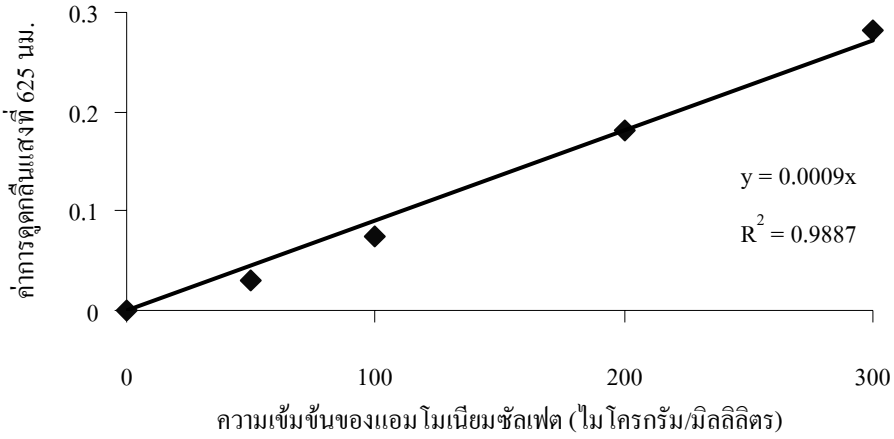
สารละลายมาตรฐานแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 50 100 200 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้สารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวเจือจาง

8.2 วิธีการทดลอง

ใส่ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 20 ไมโครลิตรในหลอดทดลองขนาด 15 x 160 มิลลิเมตร ผสมให้เข้ากับสารละลาย A ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย B ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 20 นาที จึงวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อคำนวณหาปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนของตัวอย่าง ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างในกรณีของ blank

8.3 กราฟมาตรฐานสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต

ใช้สารละลายมาตรฐานแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่าง ๆ แทนตัวอย่างตามวิธีในข้อ 8.2 เขียนกราฟมาตรฐานสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตโดยให้แกนตั้งเป็นค่าการดูดกลืนแสงและแกนนอนเป็นความเข้มข้นของสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต



ภาพผนวกที่ ก10 กราฟมาตรฐานสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต

ภาพผนวกที่ ก11 เครื่องบีบอัด