ภาคผนวก

วิธีการวิเคราะห์

<u>วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักวัตถุแห้ง</u>

1. น้ำหนักเส้นใยแห้ง (Mycelia dry weight) (ดัดแปลงจาก AOAC., 1999)

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมจานแก้วเลี้ยงเชื้อที่ล้างสะอาดและผ้าขาวบางตัดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2. ตวงตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร หรือน้อยกว่า กรองผ่านผ้าขาวบาง ซึ่งทราบน้ำหนักที่แน่นอน ล้างด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

3. นำเส้นใยบนผ้าขาวบางวางบนจานแก้วเลี้ยงเชื้อที่ทราบน้ำหนักแน่นอน

4. อบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

5. ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น 45 นาที

6. ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

ชุดควบคุมคือเส้นใยน้ำทิ้งเริ่มต้น (วันเริ่มต้นการทดลอง) ทำเช่นเดียวกับข้อ 1-6

$$\text{น้ำหนักแห้งของเส้นใย (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{น้ำหนักแห้งของเส้นใยสุดท้าย-น้ำหนักแห้งเส้นใยชุดควบคุม} \times 100}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)}}$$

2. การวัดปริมาณผลผลิตของพอลิเมอร์ชีวภาพที่ยังไม่ผ่าน การทำให้บริสุทธิ์

วิธีการวิเคราะห์

1. หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ออกจากตัวอย่างน้ำทิ้งที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที

2. นำเซลล์ที่ได้ไปทำ freeze dryer จนแห้ง ใช้ตัวอย่าง 40 g เติมร้อยละ 1 ของ sodium dodecyl sulfate (SDS) 500 ml ทิ้งไว้ข้ามคืนโดยภายใต้สภาวะที่มีการกวน

3. นำเซลล์ที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง

4. นำเซลล์ที่ได้ไปทำ freeze dryer ใช้ตัวอย่าง 10 g เติม 1 M NaOH 300 ml ทิ้งไว้ 2-3 ชม. โดยภายใต้สภาวะที่มีการกวน

5. นำเซลล์ที่ได้หมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างด้วย 1 M NaOH 3 ครั้ง

6. นำส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนด้วยเอทานอลที่เย็น (-20 องศาเซลเซียส) ปริมาณ 4 เท่าของปริมาตรน้ำหมัก ทิ้งไว้ค้างคืน

7. นำมาหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่ได้มาอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และชั่งหาน้ำหนักที่ได้

<u>วิธีการวิเคราะห์คุณลักษณะของน้ำเสีย</u>

1. ซีโอดี (APHA, AWWA and WEF, 1998)

สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต เข้มข้น 0.25 นอร์นอล ละลายในโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ซึ่งอบแห้งที่ 103 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 12.259 กรัมในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟามิก (NH_2SO_3H) (0.12 กรัม) แล้วเจือจางจนปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

2. Sulfuric acid reagent

ละลายซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) กรัม ในกรดซัลฟูริกเข้มข้นบรรจุขวดขนาด 1 ปอนด์ (2.65 ลิตร) เนื่องจากซิลเวอร์ซัลเฟตจะละลายยากมาก อาจต้องใช้เวลา 1-2 วัน จึงละลายหมด

3. สารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.10 นอร์มอล

3.1 การเตรียมสารละลาย

ละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_26H_2O$) จำนวน 39 กรัม ในน้ำกลั่นเติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

3.2 การหาความเข้มข้นของสารละลาย

ปิเปตสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต (0.25 นอร์มอล) จำนวน 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม Sulfuric acid reagent 30 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็น ไตเตรตด้วยสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต เติมเฟอร์โรอิน 2-3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์

$$\text{ความเข้มข้น (นอร์มอล)} = \frac{\text{ปริมาณสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (มล.)} \times 0.25}{\text{ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (มล.)}}$$

4. สารละลายเฟอร์โรอิน

ละลาย 1-10 ฟีแนนโทรลีนโมโนไฮเดรต ($C_{12}H_8N_2H_2O$) จำนวน 1.485 กรัม และเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$ $7H_2O$) จำนวน 0.695 กรัม เติมน้ำจนปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5. ซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) ชนิดผง

6. เมอร์คิวรีซัลเฟต ($HgSO_4$) ชนิดผลึกบริสุทธิ์ หรือเป็นผง ใช้เป็นตัวกำจัดอนุภาคคลอไรด์ (Cl) ในอัตราส่วน $HgSO_4$ ต่อ Cl = 10 : 1

7. กรดซัลฟามิก (Sulfamic acid) ใช้ในกรณีกำจัดไนไตรต์เท่านั้น

วิธีการวิเคราะห์

1. หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากตัวอย่างน้ำทิ้ง 10,000 รอบต่อนาที นาน 7 นาที แยกตะกอนทิ้ง นำส่วนใสเจือจางที่เหมาะสมให้ได้ 20 มิลลิลิตรสำหรับวิธีการของ Soluble COD ส่วน Total COD ใช้น้ำทิ้งคีแคนเตอร์โดยไม่ต้องหมุนเหวี่ยงเจือจางที่เหมาะสมให้ได้ 20 มิลลิลิตร

2. เติมเมอร์คิวรีซัลเฟต 0.4 กรัม ลงในขวดกลม

3. เติมตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร หรือส่วนของตัวอย่างเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 20 มิลลิลิตร

4. เติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 10 มิลลิลิตรและลูกแก้ว (glass beads) 3-5 เม็ด

5. ค่อยๆ เติม Sulfuric acid reagent 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเพื่อละลายเมอร์คิวรีซัลเฟต ควรทำให้เย็นขณะเขย่า เพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเสียของสารที่เป็นไอในตัวอย่าง (อาจแช่ในอ่างน้ำ)

6. กลั่นด้วยอุปกรณ์กลั่นไหลกลับ ประมาณ 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็น

7. ไทเทรตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตที่เกินพอด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ใช้เฟอร์โรอินเป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อถึงจุดยุติสีจะเปลี่ยนจากเขียวปนน้ำเงินเป็นสีน้ำตาลปนแดง

8. ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แทนตัวอย่างน้ำ ทำเช่นเดียวกับตัวอย่างข้อ 2-7

$$\text{ซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{(A-B) \times N \times 8 \times 1{,}000}{\text{ปริมาณตัวอย่าง}}$$

A คือ ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรต blank

B คือ ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (นอร์มัล)

2. ของแข็งทั้งหมด (Total solids) (APHA, AWWA, and WEF, 1998)

วิธีการวิเคราะห์

1. นำถ้วยระเหยล้างให้สะอาด อบให้แห้งในตู้ที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2. ตวงตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร หรือน้อยกว่าใส่ลงในถ้วยระเหยที่ทราบน้ำหนักแน่นอน

3. นำไประเหยให้แห้งในอ่างไอน้ำ

4. อบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5. ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ประมาณ 45 นาที

6. ชั่งน้ำหนัก

$$\text{ของแข็งทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักของแข็ง (มก.)} \times 1{,}000}{\text{มล. ตัวอย่าง}}$$

3. ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (total suspended solids) (APHA, AWWA and WPCF, 1985)

วิธีการวิเคราะห์

1. การเตรียม gooch crucible วางกระดาษกรองลงใน gooch crucible ผ่านน้ำกลั่นลงไปใช้เครื่องดูดอากาศดูดให้แห้ง นำไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก

2. สำหรับตัวอย่างที่มีสารห้อยแขวนมากทำให้กรองได้ช้า ให้เลือกปริมาตรของตัวอย่างที่จะใช้ ซึ่งจะต้องเท่ากับ 14 มิลลิลิตรต่อลูกบาศก์เซนติเมตรของกระดาษกรอง

3. นำเอา gooch crucible ซึ่งเตรียมใส่ในที่สำหรับดูดอากาศ ทำกระดาษกรองให้เปียกด้วยน้ำกลั่น เปิดเครื่องดูด วัดปริมาตรตัวอย่างโดยใช้ปิเปตปลายกว้างหรือกระบอกตวงหรือ volumetric flask แล้วกรองล้าง 3 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่น ครั้งละ 10 มิลลิลิตร ใช้เครื่องดูดอากาศดูดจนแห้ง นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น

4. ทำการชั่งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน

การคำนวณ

$$\text{ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{มิลลิกรัมของแข็งแขวนลอย} \times 1{,}000}{\text{มิลลิกรัมของตัวอย่าง}}$$

4. น้ำมันและกรีสในน้ำทิ้ง (ดัดแปลงจาก กรรณิการ์ สิริหิงห, 2522)

สารเคมี

1. ปิโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether)
2. กระดาษกรอง เบอร์ 40
3. Diatomaceous-silica filter and suspension 10 กรัมต่อลิตรน้ำกลั่น
4. ผ้าขาวบาง

วิธีการวิเคราะห์

1. วางกระดาษกรองใน buchner funnel แล้วเทสารละลาย filter acid ที่เตรียมไว้ 100 มิลลิลิตร ใช้เครื่องดูดสุญญากาศดูด ล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 10 มิลลิลิตร จนกระทั่งแห้ง
2. กรองตัวอย่างที่เตรียมไว้ แล้วดูดให้แห้ง
3. ใช้ปากคีบกระดาษกรองออกมา ม้วนกระดาษกรองเข้าด้วยกัน แล้วห่อด้วยผ้าขาวบาง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
4. ใส่ลงในซอคเลต
5. เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียม อีเทอร์ ลงในขวดสกัดไขมัน 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตา
6. ประกอบอุปกรณ์สกัด พร้อมทั้งน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่น แล้วเปิดสวิทซ์ให้ความร้อน
7. ใช้เวลาในการสกัด 4 ชั่วโมง เมื่อครบแล้ว กลั่นเก็บสารละลายจนเหลือสารละลายในขวดสกัดเพียงเล็กน้อย นำตัวอย่างที่ใส่ในหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอคเลต
8. นำขวดสกัดนั้นไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส จนแห้งใช้เวลาประมาณ 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
9. ชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณของกรีส หรือน้ำมัน (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักของสารที่สกัดได้} \times 1{,}000}{\text{มิลลิกรัมของตัวอย่าง}}$$

5. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl method (A.O.A.C., 1990)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4)
2. สารช่วยเร่งการย่อย (catalyst) ประกอบด้วย $CuSO_4$ 1 ส่วน และ K_2SO_4 10 ส่วน
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้นร้อยละ 40
4. กรดบอริก (H_3BO_3) เข้มข้นร้อยละ 40
5. mixed indicator

5.1 ชั่ง 0.125 กรัม เมทิลเรด และ 0.082 กรัม เมทิลีนบลูละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

5.2 ชั่ง 0.1 กรัม โปรโมครีซอลารีนละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5.3 ผสมสารละลายข้อ 1 และข้อ 2 ในอัตราส่วนสารข้อ 1 ต่อสารข้อ 2 เท่ากับ 5 ต่อ

วิธีการ

การย่อยตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่าง 0.2-0.5 กรัม หรือ 5-10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดย่อยตามปริมาณไนโตรเจนที่คาดว่าจะมี ถ้ามีมากก็ใช้น้อย ถ้ามีน้อยก็ใช้มาก (ทำ blank ทุกครั้ง)
2. ใส่สารช่วยเร่งการย่อย (catalyst) 1-2 กรัม
3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5-10 มิลลิลิตร สวมและเปิดเครื่องจับไอกรด
4. ย่อยที่อุณหภูมิเริ่มต้นประมาณ 200 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นจนถึง 350 องศาเซลเซียส จะใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง
5. เมื่อย่อยจนใสหรือได้สารละลายสีฟ้าหรือสีเขียวอมฟ้า ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
6. นำไปกลั่น

การกลั่นตัวอย่าง

1. ใส่ตัวอย่างใส่ในหลอดกลั่น เติมน้ำประมาณ 60-100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เพื่อผสมกรด
2. ใส่หลอดเข้ากับเครื่องกลั่นที่พร้อมจะกลั่นเปิดน้ำหล่อเย็น อัตราการไหลประมาณ 3-4 ลิตรต่อนาที

3. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 40 ลงไปช้าๆ จนได้สารละลายสีดำ

4. เริ่มกลั่นโดยใช้กรดบอริก (ร้อยละ 2) ที่มีการเติม mixed indicator (2-3 หยด) ประมาณ 10 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร รองรับ condensate โดยให้ปลายท่อจมอยู่ใต้กรด

5. กลั่นให้ได้ condensate ประมาณ 100-150 มิลลิลิตร ก่อนเสร็จการกลั่นในแต่ละครั้ง ให้เลื่อนฟลาสก์เก็บตัวอย่างลงให้พ้นของเหลว กลั่นต่อประมาณ 1 นาที เพื่อล้างเครื่องกลั่น

6. ไตเตรทกับ 0.02-0.1 นอร์มอล HCl หรือ H_2SO_4 หักค่า blank ออกเพื่อนำไปคำนวณ

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ร้อยละ)} = \frac{(A-B)\times N\times 14}{W}$$

A คือ ปริมาณของกรดไฮโดรคลอไรด์ที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง

B คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับ blank

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มอล)

6. ฟอสฟอรัสทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในน้ำทิ้ง วิเคราะห์ตามวิธีการมาตรฐาน DIN 38402 A51 ด้วยเครื่องยูวี-สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Spectrogant Nova 60 วัดสีของสารประกอบเชิงซ้อนโมลิบดินัมวานาเดท (molybdenum vanadate) ชั่งตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ

1. การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson, 1944)

วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เช่น กลูโคส ไซแลน โดยการทำปฏิกิริยากับสารละลายคอปเปอร์ เกิดสีโมลิบดินัมบลู (molybdenum blue) ดังปฏิกิริยา

1. $2Cu^{2+}$ + reducing sugar ----------► CuO_2
2. $Cu_2O + H_2SO_4$ ----------► $2Cu^{+}$
3. $2Cu + MoO4_2+$ ----------► $2Cu^{2+}$ + molybdenum blue

อุปกรณ์

เครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์

สารเคมี

1. Somogyi Reagent

Solution I : ประกอบด้วย

Sodium potassium tartrate (Rochelle salt)	12	กรัม
Na_2CO (anhydrous)	24	กรัม
$NaHCO_3$	16	กรัม
Na_2SO_4 (anhyhydrous)	144	กรัม
น้ำกลั่น		

(ละลายสารละลายข้างต้นในน้ำกลั่น จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร)

Solution II : ประกอบด้วย

$CuSO_4.5H_2O$	4	กรัม
NaSO4 (anhydrous)	36	กรัม
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

เตรียม Somogyi Reagent โดยผสม Solution I 4 ส่วน กับ Solution II 1 ส่วน

2. Nelson Reagent

2.1 สารละลาย ammonium molybdate $(NH_4)_6Mo7O_{24}.4H_2O$ 50 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น ปริมาตร 42 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากันดี

2.2 ละลาย Sodium arsenate (Na_2NAsO_4) 3.5762 กรัม (หรือ $Na_4NAsO_4.7H_2O$ 3 กรัม) ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2.3 เติมสารละลายข้อ 2.2 ลงในสารละลายข้อ 2.1 ผสมให้เข้ากันดี แล้วจึงบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บในขวดสีชา

วิธีการ

1.ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคส ไซแลนหรือ α ,D- galacturonic acid ความเข้มข้น 20-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส, ไซแลน หรือ α, D-galacturonic acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หรือตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบขนาดกลาง

2. เติม Somogyi Reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทำให้เย็นทันที

3. เติม Nelson reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

4. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาล

blank เติมน้ำกลั่นแทนตัวอย่าง แล้ววิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2-4 เปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐาน (กลูโคส, ไซแลนหรือ α, D- galacturonic acid)

การเตรียมสารละลายกลูโคส, ไซแลนหรือ α, D- galacturonic acidมาตรฐาน

ชั่งน้ำตาลกลูโคส ไซแลนด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียด ปริมาณ 0.75 กรัม ใส่ใน volumetric flask ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายดีแล้วดูดมา 2 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร จาก stock solution นี้นำมาเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีกลูโคส, ไซแลน หรือ α, D- galacturonic acid ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. วิธีวิเคราะห์แอคตีวิตี้ของเอนไซม์ไลเปส โดยดัดแปลงจากวิธีของ Lee และ Rhee (1993)

1. โดยเตรียมสารละลาย cupric acetate เข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนัก ต่อปริมาตร) ในน้ำกลั่น

2. แล้วกรองแยกส่วนไม่ละลายออก ปรับพีเอชเป็น 6.1 โดยใช้ pyridine

3. เตรียม assay mixture ต่อไปนี้ใส่ในหลวดฝาเกลียวขนาดเล็กประกอบด้วย palm oil solution (palm oil ร้อยละ 10 (w/v)ใน isooctane) 1 มิลลิลิตร, Buffer (Tris/malrate 100 mM pH 7.0 ที่ประกอบด้วย $CaCl_2$ 10 mM) 0.5 มิลลิลิตร และเอนไซม์ (ใช้สารละลายส่วนใส) 0.2 มิลลิลิตร

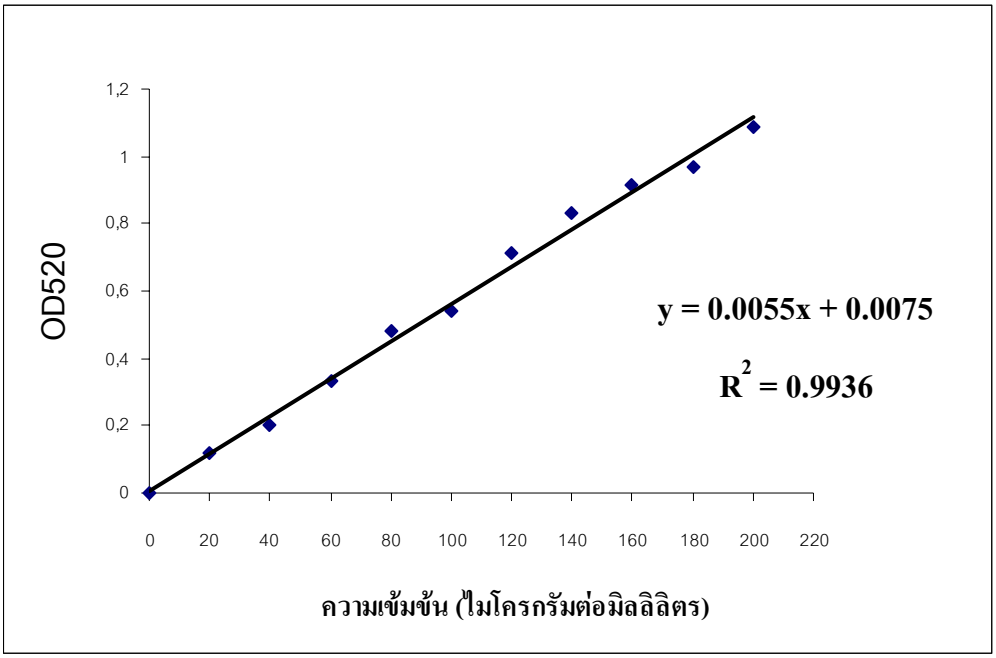
4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

5. หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 6N HCl 0.3 มิลลิลิตร. ผสมอย่างรวดเร็ว

6. ทิ้งให้แยกชั้น ดูดชั้นของน้ำมันมาเจือจางกับ isooctane ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

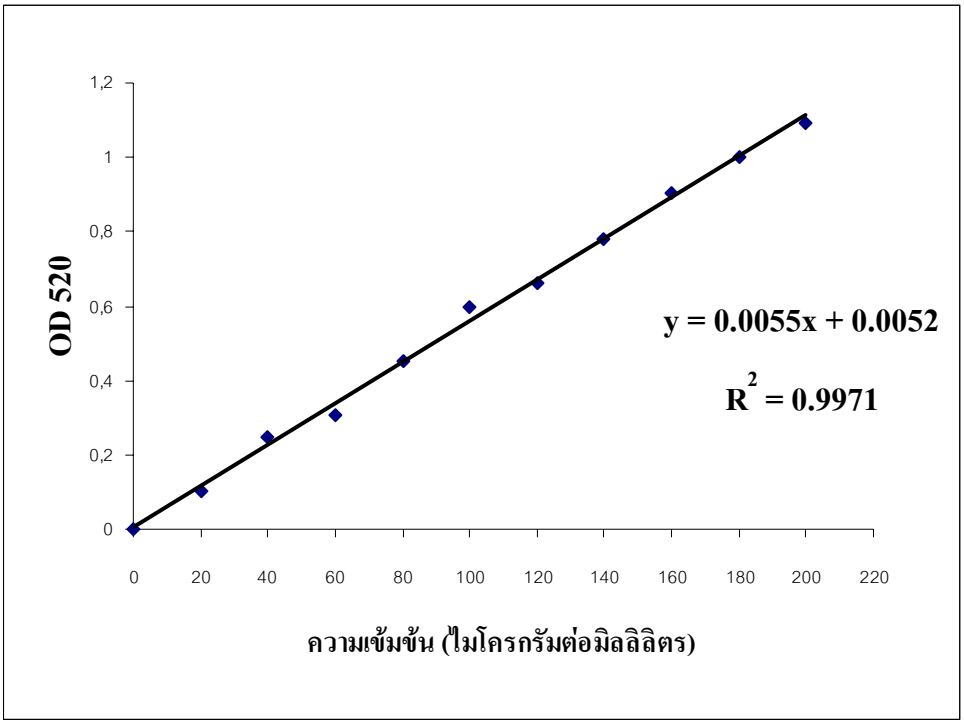
7. เติม cupric acetate-pyridine reagent 0.4 มิลลิลิตร ปั่นให้ผสมกันส่วนใสจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อน ทิ้งให้แยกชั้น

8. เอาไปวัดการดูดกลืนแสงที่ OD715 nm. เทียบกับกราฟมาตราฐานที่ใช้กรดปาล์มมิติกเป็นตัวอย่าง



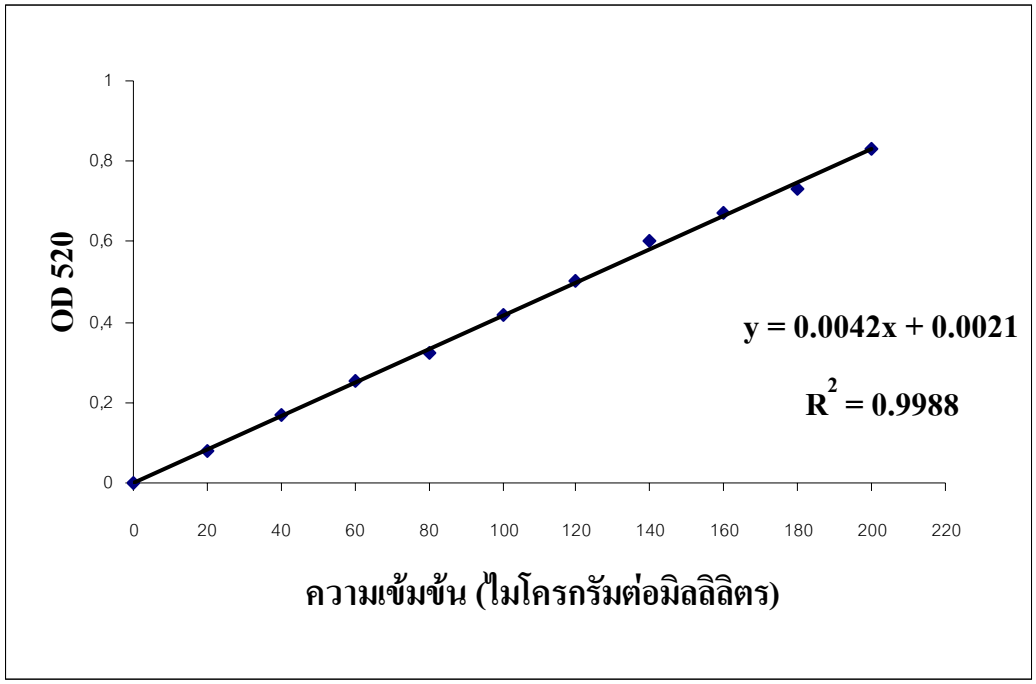
ภาพประกอบภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโกสวิเคราะห์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson

Figure-Appendix 1 Standard cure of standard solution glucose analysis by Somogyi-Nelson method



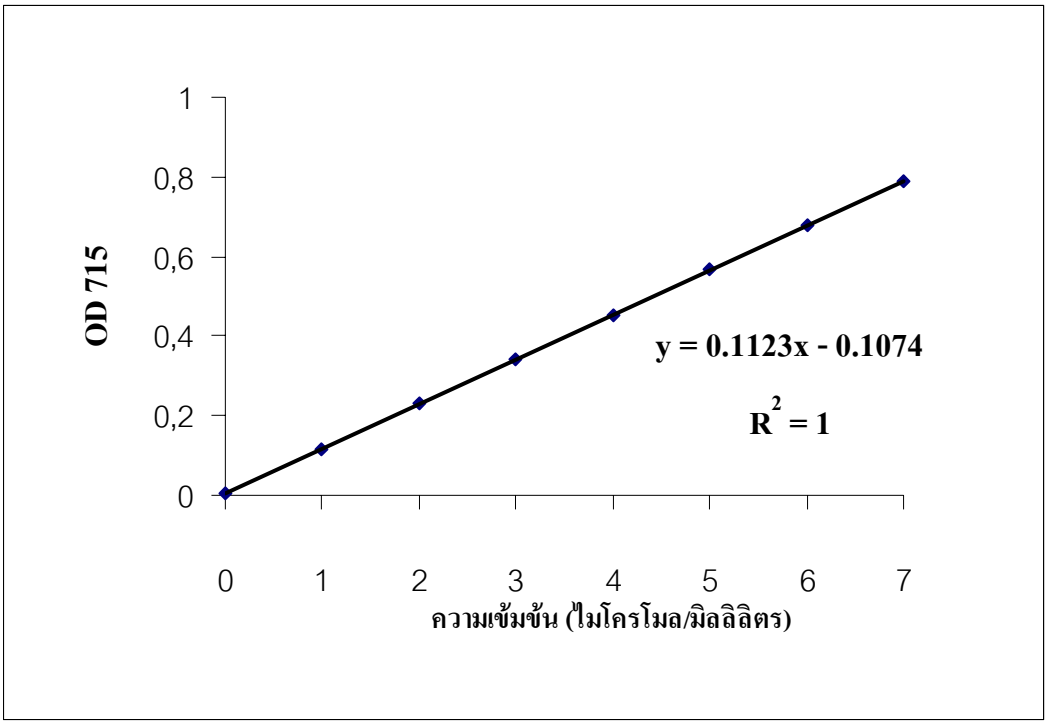
ภาพประกอบภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานของสารละลายไซแลนวิเคราะห์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson

Figure-Appendix 2 Standard cure of standard solution xylose analysis by Somogyi-Nelson method



ภาพประกอบภาคผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานของสารละลาย α, D- galacturonic acid วิเคราะห์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson

Figure-Appendix 3 Standard cure of standard solution α ,D- galacturonic acid analysis by Somogyi-Nelson method



ภาพประกอบภาคผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดปาล์มมิติกวิเคราะห์ด้วยวิธี Lee และ Rhee (1993)

Figure-Appendix 4 Standard cure of standard solution palmmitic aid analysis by Lee and Rhee method (1993).

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน วิธีของ Lowry *et al., 1951)*

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายด้วย Folin-ciocatrus phenol สามารถวัดความเข้มข้นของโปรตีนได้ถึง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความไวกว่าวิธีไบยูเรตประมาณ 60 เท่า สีโมลิบดินัมบลูที่ได้เกิดจากปฏิกิริยารีดักชั่นของสารละลายกรดฟอสฟอทังสทิกฟอสโฟโมลิบดินัมบลูที่ได้เกิดจากปฏิกิริยารีดักชั่นของสารละลายกรดฟอสฟอทังสทิกฟอสโฟโมลิบดิกด้วยฟีนอล โปรตีนแต่ละชนิดจะให้ความเข้มสีไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของกรดอะมิโนในตัวสำคัญ 2 ตัว คือ ไทโรซีนและทริปโทเฟน เป็นเทคนิคการวัดโดยวัดโปรตีนที่มีวงแหวนเบนซีน แล้ววัดสีสีดมลิบดีนัมบลูที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

สารเคมี

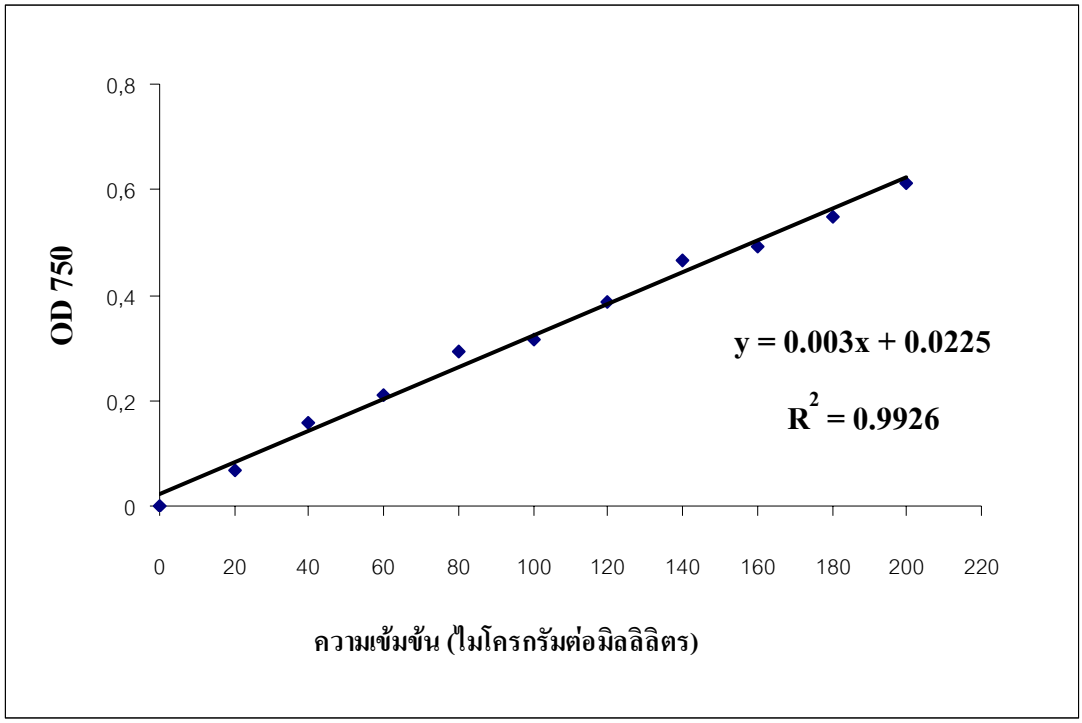
1. สารละลาย $NaCO_3$ ร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล
2. สารละลาย $CuSO_4.5H_2O$ ใน sodium postassium tartrate ร้อยละ 1.0
3. สารละลาย alkali copper เตรียมโดยสารละลาย (ในข้อ 1) 30 มิลลิลิตร กับสารละลายในข้อ 2 ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร
4. สารละลาย Folin-ciocatrus phenol reagen เจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:2 ก่อนใช้
5. สารละลาย bovine albomin protein 1 มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

1. ใช้สารละลาย bovine albomin protein ที่มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180และ 200ไมโครกรัม หรือตัวอย่างที่ความเจือจางเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย $NaCO_3$ ร้อยละ 2 ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วจึงทำให้เย็น
3. เติมสารละลาย alkali copper ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
4. สารละลาย Folin-ciocatrus phenol reagen ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับโปรตีน

เตรียมสารละลาย bovine albomin protein ที่มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180และ 200 ไมโครกรัม 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองแล้ววิเคราะห์โปรตีนตามวิธีการข้างต้น



ภาพประกอบภาคผนวกที่ 5 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA วิเคราะห์ด้วยวิธี Lowry

Figure-Appendix 5 Standard cure of standard solution protein BSA analysis by Lowry method

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่จากวิทยานิพนธ์

การเผยแพร่ในบทความวิชาการ

Binmaeil, H. Prasertsan, P. and H-Kittikun, A. 2003. Biomass production and oil removal from palm oil mill effluent by thermotolerant fungi. Poster presentation at Bio Thailand 2003. Technology for Life. 17-20 July, 2003. Pattaya Exhibition and Convention Hall (PEACH) Pattaya, Chonbury, Thailand