ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อและวิเคราะห์ activity ของเอนไซม์

1. Potato dextrose Broth (PDB)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

*ปรับ pH เท่ากับ 7

2. Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

*ปรับ pH เท่ากับ 7

3. Starch broth

Yeast extracts	2.0 กรัม
KH_2Po_4	1.3 กรัม
$MgSo_4 7H_2o$	0.5 กรัม
$Cacl_2. 2H_2o$	0.1 กรัม
Peptone	0.5 กรัม
Starch	50 กรัม
pH	7.0
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

4. Starch agar

Yeast extracts	2.0 กรัม
KH2Po4	1.3 กรัม
MgSo4 .7H2o	0.5 กรัม
Cacl2. 2H2o	0.1 กรัม
Peptone	0.5 กรัม
Starch	50 กรัม
Agar	20 กรัม
pH	7.0
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ CHIANG MAI RAJABHAT UNIVERSITY

ภาคผนวก ข

น้ำยาเคมีที่ใช้ทดสอบ

1. การเตรียมสารละลายไอโอดีนทดสอบแป้ง

เตรียมตาม Hesseltine et, al., (1963)

ละลาย KI 6.6 กรัม และ I_2 0.66 กรัมในน้ำกลั่น 165 มิลลิลิตร

2. การเตรียม Nelson-Somogy reagent (1944)

Copper reagent ละลาย $Na_2HPo_4 . 12H_2o$ 71 กรัม และ Naktartrate 40 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติม 1N NaoH 100 มิลลิลิตรลงไปผสมให้เข้ากัน เติม $Cuso_4 . 5H_2o$ 8 กรัมละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตรลงไป คนให้เข้ากันแล้วทำให้ร้อน เติม Na_2S0_4 180 กรัมละลายให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาล ตั้งทิ้งไว้ 1 ถึง 2 วัน

Nelson reagent ละลายเกลือแอมโมเนียมโมดิบเดท 50 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 900มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไป 21 มิลลิลิตรคนให้เข้ากัน เติม $Na_2HAso_4 . 7H_2o$ 6 กรัมละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรลงไป คนให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในขวดสีน้ำตาล

3. การเตรียมสารละลายไอโอดีนสำหรับหา activity ของเอนไซม์

เตรียมตามวิธีของ Smith & Roe (1949) ชั่ง KI มา 3.3 กรัม และ I_2 มา 0.33 กรัม ละลายในน้ำจนครบ 100 มิลลิลิตร

4. การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เตรียมได้จากการผสมสาร A และสาร B ตาม pH ที่ต้องการ สารละลาย A คือ 0.2 M $NaH_2PO_4 . 2H_2O$ (31.2 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร) สารละลาย B คือ 0.2 M $Na_2HPO_4 . 7H_2O$ หรือ $Na_2HPO_4 . 12H_2O$ (53.65 กรัม หรือ 71.7 กรัมตามลำดับในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

A (ml)	B (ml)	pH
93.5	6.5	5.7
45.0	55.0	6.9
39.0	61.0	7.0
33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0
68.5	31.5	6.5
5.3	94.7	8.0

5. การเตรียม Methyl red solution

methyl red	0.1 กรัม
ethanol	300.0 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	200.0 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ CHIANG MAI RAJABHAT UNIVERSITY

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ปฏิกิริยาทางเคมี

1. ดัดแปลงวิธีวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์ของ Nelson-Somogy (Nelson, 1944)

ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่มีน้ำตาลกลูโคสประมาณ 1-50 ไมโครกรัม จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ เติมสารละลาย Copper ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือด 10 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นทันที เติมสารละลาย Nelson ลงไป 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 15 ถึง 40 นาที นำไปวัด OD ที่มีความยาวช่วงคลื่น 520 นาโนเมตร ทำ Standard กลูโคส ความเข้มข้นต่างๆ กัน นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่าง ค่า OD และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเป็นไมโครกรัมที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

การวิเคราะห์หา activity ของเอนไซม์โดยวิธีของ Nelson-Somogy (Nelson, 1944)

ใช้ปิเปตดูดซับสเตรท (แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซนต์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต้มจนเดือด) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ เติมสารละลายเอนไซม์ จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ลงไปผสมกัน บ่มใน Water bath อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงเติม Copper reagent ลงไป 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นก็ทำการทดลองเหมือนการหาน้ำตาลรีดิวส์ วัดค่า OD ที่ได้นำไปอ่านค่าใน Standard กลูโคส จะได้ค่า RS_1 อีกส่วนหนึ่งต้มเอนไซม์ก่อนแล้วจึงใส่ลงในซับสเตรทในปริมาตรเท่ากัน วัดค่า OD แล้วนำค่าไปอ่านใน Standard กลูโคส จะได้ RS_0

$$\text{Activity} = RS_0 - RS_1$$

1 unit ของเอนไซม์ คือ เอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลส์แป้งได้น้ำตาลกลูโคส 1 มิลลิกรัมภายในเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

2. การวิเคราะห์ activity ของเอนไซม์อไมเลสตามวิธีของ Smith& Roe (Smith and Roe, 1949)

ดัดแปลงมาโดยใช้ซับสเตรทแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ในฟอสเฟตบับเฟอร์ pH ต่างๆ กัน ปีเปตซับสเตรทมา 0.5 มิลลิลิตรใส่หลอด เติม 0.5 M $Cacl_2$ 0.1 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ลงไปผสมกัน บ่มใน Water bath อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม 1N HCl 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเติมสารละลายไอโอดีน 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร นำไปวัดค่า OD ที่มีความยาวช่วงคลื่น 620 นาโนเมตร อีกหลอดหนึ่งต้มเอนไซม์ก่อนแล้วจึงใส่ลงในซับสเตรท blank ใช้น้ำกลั่น activity คำนวณโดย

$\frac{Abc - AbD}{Abc}$ × จำนวนแป้งเริ่มต้นเป็นมิลลิกรัม = จำนวนแป้งเป็นมิลลิกรัมที่ถูกย่อยสลาย

Abc คือ OD ของเอนไซม์ที่ต้มแล้ว

AbD คือ OD ของปฏิกิริยาที่เอนไซม์ย่อยสลายแล้ว

1 unit ของเอนไซม์ คือ เอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลส์แป้งได้น้ำตาลกลูโคส 1 มิลลิกรัมภายในเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

3. การวิเคราะห์ปฏิกิริยาการเกิดสีของน้ำแป้งโดยวิธีของ Hesseltine (Hesseltine , Smith and Bradie,1963)

ตรวจสอบผลแป้งที่เหลือ ทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีน เกิดสีโดยใช้ ไมโครปิเปตดูดน้ำแป้งที่มีเชื้อมา 20 ไมโครลิตร ลงบนจานหลุม หยดสารละลายไอโอดีน 20 ไมโครลิตร ลงไปผสม กันให้ทั่ว สังเกตสีที่เกิดขึ้น ตามปริมาณแป้งที่เหลือ หรือโดยให้เครื่องหมาย ดังนี้ + สารละลายสีน้ำเงิน ++ สารละลายสีน้ำตาลเข้ม +++สารละลายสีน้ำตาลอมเขียว +++ สารละลายสีเหลือง เก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้สารละลายสีเหลืองและสีน้ำตาลอมเขียวเพราะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดี

จุลินทรีย์ที่ให้สารละลายสีเหลือง คือ *Bacillus amyloliquefaciens* และ*Bacillus subtilis*, จุลินทรีย์ที่ให้สารละลายสีน้ำตาลอมเขียว คือ *Aspergillus oryzae*, *Bacillus licheniformis* และ *Candida* sp. จุลินทรีย์ที่ให้สารละลาย สีน้ำตาลเข้ม คือ *Aspergillus awamori* และ *Pichia* sp. ส่วนจุลินทรีย์ที่ให้สารละลายสีน้ำเงิน คือ *Aspergillus niger* และ *Pichia acacia*

ภาคผนวก ง

คู่มือการบำบัดน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตขนมจีนจากผงเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis*

1. **ลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์**

   เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน สร้างแคปซูลและเอนโดสปอร์ได้

2. **คุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์**

   มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ไลเปส และมีความสามารถในการปรับตัวและทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญได้ดี เจริญเติบโตได้ดี ที่ pH ~ 7 (6.6-7.5) และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต ~ 40-50 องศาเซลเซียส

3. **วิธีการนำจุลินทรีย์ไปใช้**

   นำผงเชื้อจุลินทรีย์ 1 กรัม เติมลงในน้ำสะอาด 1 ลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำหัวเชื้อที่ได้ไปผสมลงในบ่อน้ำทิ้งขนมจีน ควรมีการกวนน้ำทิ้งในบ่อพัก 3-4 ครั้งต่อวันเพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์ในบ่อน้ำทิ้ง เพราะ *Bacillus subtilis* เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต เมื่อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตได้ดีก็จะผลิตเอนไซม์อะไมเลสออกมาเพื่อย่อยปริมาณสารประกอบคาร์โบไฮเดรตในน้ำทิ้งได้ดี ทำให้ปริมาณความเข้มข้นของแป้งในน้ำทิ้งลดลง

4. **การเก็บรักษา**

   เก็บจุลินทรีย์ในที่แห้งที่อุณหภูมิห้อง

5. **หน่วยงานที่สามารถติดต่อเพื่อขอรับเชื้อจุลินทรีย์**

   ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน โทร 02-579-1026 ต่อ 1298