บรรณานุกรม

ภาษาไทย

กาญจนา ชาญสง่าเวช, "วิธีวินิจฉัยชนิดและนับจำนวนแพลงค์ตอนพืช," วารสารวิทยาศาสตร์, 35, 588-589, สิงหาคม 2524.

ไกรฤกษ์ ธวัชพันธุ์, "การเลี้ยงรา *Rhizopus oryzae* บนอาหารแข็งเพื่อผลิตกลูโคอะไมเลส," วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2526.

จตุรพร พรศิลปทิพย์, "เอนไซม์ย่อยสลายแป้งดิบจากเชื้ออะไมโลไมซีส," วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2528.

จรัญ จันทลักขณา, สถิติวิธีวิเคราะห์และวางแผนงานวิจัย, หน้า 54-267, สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช, กรุงเทพมหานคร, พิมพ์ครั้งที่ 5, 2527.

พันทิพา สุนทรารชุน, ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการวางแผนงานทดลอง, ศรีเมืองการพิมพ์, กรุงเทพฯ, 2525.

พิเชฐ อิฐกอ, "การผลิตแอลฟาอะไมเลสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* KA 63," วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2528.

วรัญญา ผ่านเจริญ, "สถานภาพและศักยภาพของเอนไซม์ย่อยแป้งในประเทศไทย," รายงานวิจัยต่อศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและการพลังงาน, คณะเศรษฐศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2528.

สุกัญญา จันทชุม, "การผลิตและการใช้ประโยชน์ของกลูโคอะไมเลสจากเชื้อจุลินทรีย์," วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต, ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2524.

ภาษาต่างประเทศ

Aiba, S., A. E. Humphrey, and N. F. Millis, Biochemical Engineering, University of Tokyo Press, Japan 2nd ed., 1973.

Amano Pharmacentical Co. Ltd., Jpn. Kokai Yokyo Koho Jp. 6,075,243, Apr 27, 1985.

Andrzejczuk-Hybel, J., K. Bartoszewica, J. Kaczkowshi, M. Kujawski, K. Piller, M. Rykala-ziobro, and A. Zajac, "Obtaining of Concentrated Glucoamylase Preparations and Control of Their Stability during Storage," Acta Alimentaria Polonia, 3 (2), 151-160, 1977.

Aunstrup, K., "Preparation of Amyloglucosidase," US. Pat. 3,677,902, July 18, 1972.

Baribo, L. E., "Amyloglucosidase Production by *A. phoenicis*," U.S. Pat, 3,298,926, Jan 17, 1967.

Barton, L. L., C. E. Georgi, and D. R., Lineback, "Effect of Maltose on Glucoamylase Formation by *A. niger*," J. Bact., 111 (3), 771-777, 1972.

Berchtold, Johan, Meuser, and Friedrich, Eur. Patent. Appl. EP. 154, 135, Sep 11, 1985, DE. Appl. 3,402,778, Jan 27, 1984.

Bernfeld, P. "Amylase, α and β," Method in Enzymology (Colowick, P. S. and O. N. Kaplan. eds.), 1,149, Academic Press Inc. Publishers, NY., 1955.

Chen, H. C., and R. R. Zall, "Concentration and Fractionation of Clam Viscera Proteinase by Ultrafiltration," Process Biochem., 20 (2), 46-50, 1985.

Crueger, W., and A. Crueger, Biotechnology: A Textbook of industrial Microbiology, English Transtation edition by Science Tech., Inc. U.S.A. (Brock, T. D. ed.), 168-169, Donnelley, R. R. & Co., U.S.A., 1984.

Chiang, B., and J. A. Johnson, Cereal Chem., 54, 429, 1977.

Cochran, T. W., and J. R. Vercellotti, "Hexosamine Biosynthesis and Accumulation by Fungi in Liquid and Solid media," Carb. Res., 61, 529-543, 1978.

Clark, J. M., R. W. Switzer, Experimental Biochemistry, pp. 147-152, W. H. Freeman and Co., San Francisco, 2nd ed., 1977.

Dobrick, L. J., J. Biol. Chem., 231, 403, 1958.

Forgary, W. M., and C. T. Kelly, "Starch-Degrading Enzymes of Microbial Origin," Progress in Industrial Microbiology, (Bull, M. J. ed.) 15, 89-90, Elsevier Scientific Publishing Co., Netherland, 1979.

Hacking, A. J., Economic Aspects of Biotechnology, (Cambridge Studies in Biotechnology: 3) Cambridge Univ. Press, Cambridge UK, 148, 1986.

Hayashida, S., "Selective Submerged Productions of Three Types of Glucoamylases by a Black Koji Mold," Agric Biol. Chem., 39 (11), 2093-2099, 1975.

Hayashida, S., T. Nomura, E. Yoshino, M. Hongo, "The Formation of Properties of Subtilisin-Modified Glucoamylase," Agric. Biol. Chem., 40(10), 141-146, 1976.

Hayashida, S., and E. Yoshino, "Formation of Active Derivatives of Glucoamylase I during the Digestion with Fungal Acid Protease and Mannosidase," Agric. Biol. Chem., 42 (5), 927-933, 1978.

Hoogendoorn, H., "Activation of the Salivary Peroxidase Antimicrobial System: Clinical Studies," Immunol. Ser., 27, 217-227, 1985.

Johnson, A. R., "Improved Method of Hexosamine Determination," Anal. Biochem., 44, 682-635, 1971.

Manjunath, P., and M. R. Raghavendra Rao, J. Biosci., 1,409, 1979.

Manjunath, P., B. C. Shenoy and M. R. Raghavendra Rao, "Fungal Glucoamylase," J. of Appl. Biochem., 5, 235-260, 1983.

Middleton, J. E., Clin. Chem. Acta., 22, 433, 1968.

Moriyama, S., S. Kataoka, K. Nakamishi, R. Matsumo, T. Kamikuto., "Thermal Stability of immobilized Glucoamylase in the Presence of a Substrate," Agric. Biol. Chem., 44(11), 2737-2739, 1980.

Narahara, H., Y. Koyoma, T. Yoshino, C. Pichyangkura, R. Ueda, and H. Taguchi, "Growth and Enzyme Production in a Solid State Culture of *A. niger*," J. Ferment Technol., 60, 311-319, 1982.

NOVO Industri, "A Simple and Easy to Use Method For the Determination of Amyloglucosidase Activity," NOVO Enzyme Information No. 082a-GB., 1973.

____, "Proteolytic Enzyme for the Modification of Food Proteins," NOVO Enzyme Information NO. 163b-GB., 1977.

____, "NOVO Method for the Determination of Amyloglucosidase Activity," NOVO Enzyme Information No. AF 22/4 - GB., 1978.

Paul, R. M., Process Biochem., 13 (2), 12, 1978.

Pichyangkura, S., V. Suratanakavikul, S. Nagai, and K. Taguchi, "Production of Liquefying and Saccharyfying Amylase by Solid State Cultivation on Thai Rice," Microb. Utiliz. Rew. New. Res., (Taguchi, H. ed.), 2, 415-418, Songkla Thailand, 1981.

Qadeer, M. A., and T. Kansar, "Nutritional Studies of *A. awamori* for the Production of Amyloglucosidase," Pakistan J. Sci. Ind. Res., 14 (3), 247-250, 1971.

Sigma Chemical Company, "The Enzymatic Colorimetric Determination of Glucose in Whole Blood Plasma andSerum at 425-475 nm," Sigma Tech. Bull., No. 510, 8, St. Lonis, 1980.

Smiley, K. L., "Amyloglucosidase Production by *A. awamori*," US. Pat. 3, 301,768, Jan 31, 9167.

Smith, J. A., and J. R. Frankiewicz, "Medium Containing Enzymatically Liquefied Corn Starch," US. Pat. 4,169,013, Sept. 25, 1979.

Somogyi, M., "Noteo in Sugar Determination," J. Biol. Chem., 195, 19-22, 1952.

Sukhumavasi, J., and P. Suyanandana, "Amylase Production by Submerged Culture Mehtod," Res. Proj., No. 19-13, Rep., No. 1, TISTR, Bangkok, 1982.

Takahashi, T., Y. Tsuchida, and M. Irie, J. Biochem., (Tokyo) 92, 1623, 1982.

Van Lanen, J. M., and M. B. Smith, "Amyloglucosidase Production by *A. niger*," US. Pat. 3,418,211, Dec. 24, 1968.

Wang, D. I. C., C. L., Cooney, A. L. Demain, P. Dunnill, A. E. Humphrey, and M. D. Lilly, Fermentation and Enzyme Technology, pp. 174-176, John Wiley & Sons, Canada, 1979.

Yoshino, E., and S. Hayashida, "Enzymatic Modification of Glucoamylase of *A. awamori* var *kawachi*," J. Ferment. Technol., 56 (4), 289-295, 1978.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

เอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งได้จากจุลินทรีย์

เอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งได้จากจุลินทรีย์ แบ่งเป็น 6 กลุ่มคือ

1. เอนไซม์ที่สามารถสลายพันธะอัลฟา 1,4 และข้ามพันธะอัลฟา 1,6 ไปได้ เช่น อัลฟาอะไมเลส

2. เอนไซม์ที่สลายพันธะอัลฟา 1,4 และจะไม่สามารถข้ามพันธะอัลฟา 1,6 ได้ จะหยุดการย่อยแป้งที่พันธะอัลฟา 1,6 จุดนั้น เช่น เบตาอะไมเลส

3. เอนไซม์ที่สลายพันธะอัลฟา 1,6 เช่น กลูโคอะไมเลส

4. เอนไซม์ที่สลายพันธะอัลฟา 1,6 เท่านั้น เช่น พูลลูลาเนส (pullulanase) ไอโซอะไมเลส (isoamylase)

5. เอนไซม์ที่สลายพันธะอัลฟา 1,4 ใน แซคคาไรด์สายสั้น (Oligosaccharide) ที่เกิดจากการย่อยสลายแป้งของเอนไซม์อื่น ได้แก่ อัลฟากลูโคซิเดส (α-glucosidase)

6. เอนไซม์ที่ย่อยแป้งได้เป็นโพลิเมอร์เป็นวงกลม (non-reducing cyclic D-glucosyl polymers) เรียก ไซโคลเดกซตริน (cyclodextrin) ได้แก่ อะไมเลสจาก *Bacillus macerans*

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก (ต่อ)

ความเหมือนและแตกต่างระหว่างอะไมเลส

คุณสมบัติ	อัลฟาอะไมเลส	เบตาอะไมเลส	กลูโคอะไมเลส
กลไกการย่อยแป้ง	ที่กลางโมเลกุลแป้ง	ที่ปลายโมเลกุลแป้ง	ที่ปลายโมเลกุลแป้ง
ผลิตภัณฑ์ที่ได้	สารผสมของโอลิโกแซคคาไรด์	มอลโตส	กลูโคส
คอนฟิกูเรชันของหน่วยรีดิวส์ที่ได้ใหม่ (configuration of new reducing unit)	อัลฟา	เบตา	เบตา
ความเร็วในการลดความหนืด	เร็ว	ช้า	ช้า
ความเร็วในการเปลี่ยนสีย้อมไอโอดีนของแป้ง	เร็ว	ช้า	ช้า
ปฏิกิริยาที่จุดแยกแขนง (branch)	ข้ามจุดที่มีพันธะอัลฟา 1,6-	ไม่สามารถข้ามจุดที่มีพันธะอัลฟา 1,6-	สามารถตัดพันธะอัลฟา 1,6-
พันธะที่เจาะจงไฮโดรไลซ์	1,4-	1,4-	1,4- 1,3 1,6

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Czapek dox agar

ซูโครส	30	กรัม
$NaNO_3$	2	กรัม
K_2HPO_4	1	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
KCl	0.5	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม
น้ำ	1000	มล.

2. Potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่ง	250	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำ	1000	มล.

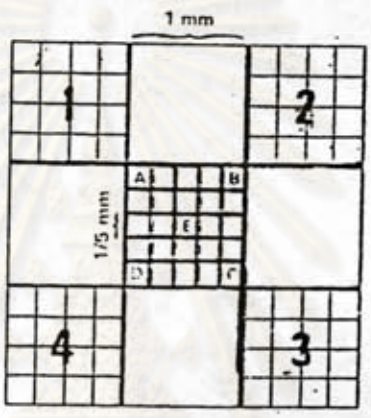
พีเอช 6.0-6.5

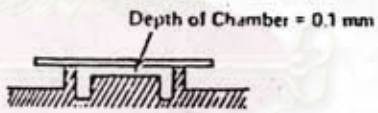
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การนับสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (กาญจนา ชาญสง่าเวช, 2524)

หาปริมาณจำนวนสปอร์โดยนับสปอร์ในช่องใหญ่ 5 ช่อง โดยในแต่ละช่องใหญ่นั้น นับ 8 ช่อง โดยนับช่องเว้นช่อง ดังแสดงในรูปข้างล่างนี้





จำนวนสปอร์ = $\frac{1}{4}$ × จำนวนสปอร์เฉลี่ยในช่องเล็ก × 10^6 สปอร์/มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

วิธีการวิเคราะห์มาตรฐาน

1. การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ โดยวิธี Somogyi-Nelson (1952)

1.1 การเตรียมสารละลาย A

$NaHPO_4 \cdot 12H_2O$	71	กรัม
โซเดียมโปแตสเซียม ทาร์เทรต	40	กรัม
น้ำกลั่น	700	มล.

ละลายให้เข้ากันแล้วเติม

NaOH 1 N	100	มล.
$CuSO_4.5H_2O$ 10%	80	มล.

ทำให้ร้อนแล้วเติม

Na_2SO_4	180	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้าย	1000	มล.

เก็บในขวดสีน้ำตาล ที่อุณหภูมิห้อง 24-28 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนกรองออกก่อนใช้

1.2 การเตรียมสารละลาย B

$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	53.2	กรัม
น้ำกลั่น	900	มล.

ละลายให้เข้ากันแล้วเติม

กรดซัลฟูริกเข้มข้น H_2SO_4 (conc)	42	มล.
$NaHAsO_4.7H_2O$ 12%	50	มล.

เก็บในขวดสีน้ำตาล 24 ชั่วโมงก่อนใช้

1.3 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ใช้ตัวอย่าง 1 มล. ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย A 1 มล. ต้ม 10 นาที ในน้ำเดือด ทำให้เย็น แล้วเติมสารละลาย B 1 มล. ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เติมน้ำ 10 มล. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 528 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดดูดกลืนแสง (spectrophotometer) นำค่าที่อ่านได้มาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

1.4 การเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

ละลายสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสให้มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100 ไมโครกรัมต่อมล. นำมาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ตามวิธีในข้อ 1.3 เขียนกราฟมาตรฐาน

2. การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยวิธี DNSA (Bernfeld, 1955)

2.1 การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิซิลิก (dinitrosalicylic acid, DNSA)

ละลายกรดไดไนโตรซาลิซิลิก 1 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ จำนวน 20 มล. เติมน้ำกลั่นลงไป 50 มล. เติมโปตัสเซียมโซเดียมทาเทรต ($C_4H_4KNaO_6.4H_6O$) 30 กรัม ทำปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

2.2 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์

เติมสารละลายไดไนโตรซาลิซิลิก 1 มล. ลงในตัวอย่าง 1 มล. ต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นเติมน้ำ 10 มล. เขย่าให้เข้ากันวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

ทำกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายมอลโตส หรือสารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8, และ 1.0 มก./มล. และใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ (blank) เขียนกราฟระหว่างปริมาณน้ำตาลมอลโตส หรือกลูโคส กับค่าดูดกลืนแสง

3. การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสด้วยวิธีพีจีโอเอนไซม์ (Peroxidase and Glucose oxidase enzymes ของ Sigma)

3.1 การเตรียมสารละลายพีจีโอ นำพีจีโอเอนไซม์ 1 แคปซูล ซึ่งประกอบด้วย กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) 500 หน่วย เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) 100 หน่วย และบัฟเฟอร์มาละลายในน้ำกลั่น 60 มล. เติมสารละลายของโอ-ไดอะนิซิดีน (o-dianisidine) 1% ในเอธานอล 95% (ethanol) ปริมาตร 0.5 มล. ทำให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น ใส่ขวดสีน้ำตาลเก็บไว้ในตู้เย็น

3.2 การหาปริมาณกลูโคส นำสารละลายที่ต้องการหาปริมาณกลูโคสมา 0.25 มล. ปรับอุณหภูมิเป็น 37 °ซ ผสมกับสารละลายพีจีโอเอนไซม์ 2.5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 30 นาที นำมาวัดค่าความดูดกลืนแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เทียบกับสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

4. การตรวจสอบการทำงานของกลูโคอะไมเลส

4.1 การเตรียมสับสเตรท ละลายแป้ง (soluble starch) 1 กรัม ในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.5 ปริมาณ 100 มล. แช่ในอ่างน้ำเดือดจนแป้งเกิดการเจลอย่างสมบูรณ์ ปรับอุณหภูมิเป็น 40 °ซ โดยแช่ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ

4.2 วิธีการวิเคราะห์ นำสารละลายเอนไซม์ที่ทำให้เจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสมด้วยสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.5 ปรับอุณหภูมิ 40 °ซ โดยแช่ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ ปิเปตมา 0.5 มล. ลงในสารละลายสับสเตรท 0.5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 40 °ซ ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ หยุดปฏิกิริยา เมื่อบ่มเป็นเวลา 0 และ 10 นาที โดยแช่หลอดในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที นำมาหาปริมาณกลูโคสโดยวิธีพีจีโอเอนไซม์ คำนวณแอคทิวิตีของกลูโคอะไมเลสโดยหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มขึ้นใน 10 นาที

กลูโคอะไมเลสแอคทิวิตี 1 หน่วย หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้ง (soluble starch) ได้กลูโคส 1 ไมโครโมล (μ mol) ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 40 °ซ และที่พีเอช 4.5

5. การตรวจวัดการเจริญของเชื้อรา

การเจริญของเชื้อราศึกษาโดยอาศัยปริมาณกลูโคซามีน (glucosamine) ในผนังเซลเป็นดัชนี ตามวิธีการของ Cochran และ Vercellotti (1978)

5.1 การสกัดกลูโคซามีนออกจากส่วนของแข็ง นำตัวอย่างจากอาหารเหลวมาปั่นด้วยเครื่องเหวี่ยงปั่นที่ 4,347 นาน 15 นาที นำส่วนของแข็งมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างแห้งมาประมาณ 0.2 กรัม ไปย่อยด้วยกรดเกลือเข้มข้น 5 มล. บ่มในน้ำเดือด 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น นำมาปรับค่าพีเอชให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เข้มข้น 30% นำไปปั่นด้วยเครื่องเหวี่ยงปั่น ทิ้งตะกอนไป นำส่วนใส (supernatant) มาปรับให้ได้ปริมาณ 15 มล. แล้วใช้วิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีน

กำหนดการเจริญของเชื้อรา เป็น มิลลิกรัมของกลูโคซามีนต่อน้ำหนักแห้งของส่วนของแข็งในอาหารเหลว (mg/dry weight)

5.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน วิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน โดยวิธีการของ Morgan-Elson ที่ปรับปรุงแล้ว (Johnson, 1971) โดยดูดสารละลายกลูโคซามีน (25-200 ไมโครกรัม) ปริมาตร 1 มล. ทำปฏิกิริยากับสารละลายของอะเซทิลอะซีโตน (ประกอบด้วยอะเซทิลอะซีโตนเข้มข้น 4% ในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 1.25 โมลาร์) ปริมาตร 1 มล. และเออร์ลิกรีเอเจนต์ (Erhlich's reagent) ประกอบด้วยพาราไดเมธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ เข้มข้น 2.67% ในสารละลายกรดเกลือเข้มข้น และเอธานอล อัตราส่วน 1:1) อีก 1 มล. ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 30 นาที ก่อนที่จะนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่มีความยาวช่วงคลื่น 530 นาโนเมตร ค่าที่วัดได้นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์

6. การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry

6.1 สารละลาย Lowry A

Na_2CO_3	60	กรัม
NaOH	12	กรัม
โซเดียมโปตัสเซียมตาเตรท	0.6	กรัม
น้ำ	300	มล.

6.2 สารละลาย Lowry B ประกอบด้วย

$CuSO_4.5H_2O$ 50 กรัม

น้ำ 1000 มล.

6.3 สารละลาย Lowry C ประกอบด้วย

สารละลาย Lowry A 50 กรัม

สารละลาย Lowry B 1 มล.

6.4 การหาปริมาณโปรตีน

ดูดสารละลายตัวอย่างที่มีโปรตีนอยู่ในช่วง 10-200 ไมโครกรัม/มล. ลงในสารละลาย Lowry C ปริมาตร 5 มล. ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที เติมสารละลายฟีนอลรีเอเจนต์ (Folin Ciocalteu's phenol reagent) ที่เจือจาง 1:1 ในน้ำ 0.5 มล. ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin)

7. การตรวจสอบน้ำตาลด้วยโครมาโตกราฟฟีกระดาษ (Clark and Switzer, 1977)

7.1 การเตรียมสารละลาย aniline acid oxalate สำหรับกระดาษโครมาโตกราฟี

7.1.1 ชั่งกรด oxalic 0.9 กรัม ละลายน้ำได้ปริมาตร 200 มล.

7.1.2 เติม aniline 1.8 มล.

เก็บสารละลายในขวดสีชาใช้พ่นบนกระดาษ

7.2 การทำโครมาโตกราฟฟีกระดาษแบบ ascending

7.2.1 นำเอนไซม์มาบ่มกับน้ำแป้ง 1% (soluble starch) ที่อุณหภูมิ 40 °ซ พีเอช 5.5 เป็นเวลา 10 นาที ต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที

7.2.2 นำตัวอย่างมา 0.005 มล. จุดบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาด 20×22 ซม. จุดสูงจากขอบกระดาษขึ้นมา 3 ซม.

7.2.3 นำสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน 1% กลูโคส, มอลโตส และไอโซมอลโตส อย่างละ 0.005 มล. จุดบนกระดาษแผ่นเดียว สูงจากขอบกระดาษขึ้นมา 3 ซม.

7.2.4 ม้วนกระดาษกรองที่จุดตัวอย่าง และสารละลายน้ำตาลมาตรฐานเป็นทรงกระบอก ใส่ในถังแก้วที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายผสม ระหว่างไอโซโปรพานอล : กรดอะซิติค : น้ำ อัตราส่วน 3:1:1 ปิดฝาให้ตัวทำละลายซึมผ่านกระดาษขึ้นมาสูง 15.5 ซม.

7.2.5 นำกระดาษออกมาพ่นด้วย aniline acid oxalate (ภาคผนวก ง) แล้วนำไปอบที่ 100-105 °ซ เป็นเวลา 5-15 นาที จะเห็นสีของจุดตัวอย่างที่ถูกตัวทำละลายชะขึ้นมา โดยน้ำตาลอัลโดเฮกโซส (Aldohexose) จะให้จุดสีน้ำตาล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

ปริมาณคาร์บอน และไนโตรเจน ในกากรำข้าวและกากถั่วเหลือง (พิเชฐ, 2528)

ตัวอย่าง	ปริมาณคาร์บอนอินทรีย์ (%)	ปริมาณไนโตรเจน (%)	คาร์บอนต่อไนโตรเจน
กากถั่วเหลือง	30.60	8.72	3.51
กากรำข้าว	35.54	3.71	9.58

ปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจน ในแป้งข้าวเหนียว วิเคราะห์ด้วย CN analyser

ตัวอย่าง	ปริมาณคาร์บอน (%)	ปริมาณไนโตรเจน (%)	คาร์บอนต่อไนโตรเจน
แป้งข้าวเหนียว	39.84	1.01	39.43

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวอย่างการคำนวณ C/N ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (C/N = 25)

สาร	น้ำหนัก (กรัม)	คาร์บอน (กรัม)	ไนโตรเจน (กรัม)
แป้งข้าวเหนียว 9.4%	63	37.450	0.949
แอมโมเนียมซิเตต 0.3%	3	0.956	0.371
กากรำ 1%	10	3.55	0.371
รวม		41.95	1.69

คาร์บอน/ไนโตรเจน = 24.8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฉ

1. การคำนวณผลบวกกำลังสองตามวิธีการของ Yate's (พันทิพา สุนทรารชุน, 2525)

ในการทดลองแบบ 2^k แฟคตอเรียล คือมี k ปัจจัยทุกปัจจัยมี 2 ระดับ Yates ได้ค้นคว้าวิธีการคำนวณผลบวกกำลังสองของอิทธิพลต่าง ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. เขียนส่วนผสม (combination) ของวิธีการทั้งหมด โดยเรียงตามลำดับ เช่น

   2 ปัจจัย คือ ปัจจัย A, B เขียน (1), a, b, ab

   3 ปัจจัย คือ ปัจจัย A, B, C เขียน (1), a, b, ab, c, ac, bc, abc

   และควรแบ่งออกเป็น 2 ช่วง ๆ ละเท่า ๆ กัน

2. หาผลรวมของคอลัมน์ที่ (1) ตอนบน โดยการจับคู่รวมกันตามลำดับ

   หาผลรวมของคอลัมน์ที่ (2) ตอนล่าง โดยการจับคู่ลบกันตามลำดับ

3. ทำคอลัมน์ที่ (3) จากคอลัมน์ที่ (2) ด้วยวิธีการเดียวกัน

   และใช้วิธีเดียวกันนี้กับคอลัมน์ต่อ ๆ ไปจนครบ k คอลัมน์ สำหรับ 2^k แฟคตอเรียล

4. จำนวนแรกในคอลัมน์ที่ k คือผลรวมทั้งหมด ($\bar{Y}...$)

   ส่วนที่เหลือคือ ตัวตั้งของ contrast ($\Sigma C_i T_i$)

   สำหรับการทดลองแบบ 2^3 แฟคตอเรียล

$$SS_{total} = \sum_{i=1}^{i} \sum_{j=1}^{j} \sum_{k=1}^{k} \sum_{l=1}^{l} Y^2_{ijkl} - Y....^2/n$$

$$SS_{q_k} = \sum_{R=1}^{k} q_k^2/n$$

$$SS_E = SS_{total} - SS_{q_k}$$

$$MS_E = SS_E/df$$

Standard error $= S\Delta_k = \sqrt{MSE/df}$

Critical value สำหรับ mean contrast $(t_{\alpha/2,\ \nu_E})(S\Delta K)$

ตาราง ฉ.1 การคำนวณค่าผลบวกกำลังสองด้วยวิธีการของ Yates 2^3 แฟคตอเรียล (พันทิพา สุนทรารชุน, 2525)

	(1)	(2)	(3) = q_k	$\Delta = q_k/r_2^{n-1}$
(1)	(1)+a	(1)+a+b+ab	(1)+a+b+ab+c+ac+bc+abc	$\bar{Y}...$
a	b+ab	c+ac+bc+abc	a-(1)+ab-b+ac-c+abc-bc	A
b	c+ac	a-(1)+ab-b	b+ab-(1)-a+bc+abc-c-ac	B
ab	bc+abc	ac-c+abc-bc	ab-b-a+(1)+abc-bc-ac+c	AB
c	a-(1)	b+ab-(1)-a	c+ac+bc+abc-(1)-a-b-ab	C
ac	ab-b	bc+abc-c-ac	ac-c+abc-bc-a+(1)-ab+b	AC
bc	ac-c	ab-b-a+(1)	bc+abc-c-ac-b-ab+(1)+a	BC
abc	abc-bc	abc-bc-ac+c	abc-bc-ac+c-ab+b+a-(1)	ABC

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การวิเคราะห์อิทธิพล ปัจจัยแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และสภาพโปรตีน

สภาพโปรตีน (A)	แหล่งคาร์บอน (B)	แหล่งไนโตรเจน (C)
ไม่ย่อย	แป้งข้าวเหนียว	กากถั่ว
ย่อย	แป้งข้าวเจ้า	กากรำ

อิทธิพลของปัจจัยหลักและปัจจัยร่วม	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	
(1)	3.77	2.22
a	3.33	1.77
b	2.22	3.11
c	3.33	5.33
ab	0.88	1.55
ac	2.00	1.55
bc	2.00	2.44
abc	6.22	4.44

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1 Yate's method

	ค่าสังเกต (total)	จำนวน factor			
		1	2	3 = q_k	$\Delta = q_k/r_2^{n-1}$
(1)	5.99	11.06	18.92	46.13	5.76
a	5.07	7.76	27.31	-2.71	-0.34
b	5.33	12.21	-3.82	-0.51	-0.06
ab	2.43	15.10	1.11	9.35	1.17
c	8.66	-0.92	-3.4	8.39	1.05
ac	3.55	-2.9	2.89	-4.93	-0.62
bc	4.44	-5.11	-1.98	-6.29	-0.79
abc	10.66	6.22	11.33	13.31	1.66*

$$SS_{total} = \sum_{i=i}^{i} \sum_{j=1}^{j} \sum_{k=1}^{k} \sum_{l=1}^{l} Y_{ijkl}^2 - Y_{....}^2/1 \times 2^k$$

$$= (3.77^2 + 2.22^2 + \ldots\ldots\ldots 4.4^2) - (46.13)^2/2 \times 2^3$$

$$= 32.21$$

$$SS_{q_k} = (1.93^2 + 0.41^2 + \ldots\ldots 9.35^2)/2 \times 2^3$$

$$= 25.40$$

$$SS_E = SS_{total} - SS_{q_k}$$

$$= 32.21 - 25.40$$

$$= 6.81$$

$$MS_E = SS_E/\nu_E$$

ν_E = ν_{total} - ν main effect - ν two factor interaction - ν three factor interaction

$$= 8$$

$\therefore$ $MS_E = 6.81/8$

$= 0.851$

Standard error of mean effect $= \sqrt{MS_E / r_2^{n-2}}$

$(S\Delta_{qk}) = \sqrt{0.851/4}$

$= 0.46$

critical value $= (t_{\alpha_2, \nu_E})(S\Delta_{qk})$

$= (t_{0.025}, 8)(0.46)$

$= (2.752)(0.46)$

$= 1.26$

นำค่า critical ไปเทียบกับค่า mean effect (Δ) (ไม่คำนึงถึงเครื่องหมาย) ของปัจจัยต่าง ๆ ถ้าค่า critical value มากกว่า หรือน้อยกว่าค่า mean effect แสดงว่าปัจจัยนั้นไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญหรือมีผลอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ตามลำดับ

2.2 Duncan's multiple Range Test (จรัญ จันหลักขณา, 2527)

$MS_E = 0.8111$

$S\bar{x} = \sqrt{MS_E / r} = \sqrt{0.811/2} = 0.635$

P	2	3	4	5	6	7	8
SSR	3.26	3.39	3.47	3.52	3.55	3.56	3.56
LSR	2.13	2.21	2.26	2.29	2.29	2.32	2.32

ลำดับค่าเฉลี่ย

ลำดับ	1	2	3	4	5	6	7	8
$\bar{X}$	1.22	1.78	2.22	2.54	2.64	3.0	4.33	5.33

สรุปการวิเคราะห์

1. แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และการย่อยโปรตีน มีผลร่วมกันกับการผลิตกลูโคอะไมเลส อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95%

2. สูตรอาหารแป้งข้าวเจ้า, กากรำที่ย่อยแล้ว กับสูตรแป้งข้าวเหนียวกากรำที่ไม่ย่อยให้ผลผลิตกลูโคอะไมเลส ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% แต่ต่างจากสูตรอาหารอื่น ๆ ทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95%

3. <u>การวิเคราะห์อิทธิพลของอุณหภูมิและพีเอช</u> (3^2 แฟคทอเรียล) Duncan's Test

A = pH / B = $T^{o}C$	5.5	4.5	3.5
30	3.03	0.78	0.16
35	5.10	3.22	0.46
40	5.88	4.55	1.15

ANOVA

SOV	df	SS	MS	F คำนวณ	F ตาราง 99%	F ตาราง 95%
A	2	20.64	10.32	4.33*	6.42	3.63
B	2	45.35	22.68	9.52**		
AB	4	3.07	0.71	0.29		
E	9	21.40	2.38			
TOTAL	17	90.47				

$S\bar{x} = 1.09$

ค่า P	2	3	4	5	6	7	8	9
SSR	3.2	3.34	3.41	3.47	3.50	3.52	3.52	3.52
LSR	3.488	3.72	3.78	3.81	3.84	3.84	3.84	3.84

ลำดับค่าเฉลี่ย

ลำดับ	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$\bar{Y}$	0.16	0.78	0.99	1.15	3.03	3.22	4.55	5.10	5.88

ลำดับที่ 5-9 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

สรุปการวิเคราะห์

1. อุณหภูมิมีผลต่อการผลิตกลูโคอะไมเลสอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 99%
2. พีเอชมีผลต่อการผลิตกลูโคอะไมเลสอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95%
3. pH พีเอช 5.5 และ 4.5 ให้กลูโคอะไมเลสไม่มีความแตกต่าง
4. อุณหภูมิ 30, 35 และ 40 °ซ ให้กลูโคอะไมเลสไม่มีความแตกต่าง

4. การวิเคราะห์ผลการหาพีเอชที่เหมาะสม

ตาราง ฉ.2 แอคทิวิตีที่พีเอชต่าง ๆ อุณหภูมิ 35 °ซ

pH / ลำดับ	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0
1	0.611	1.88	3.44	3.87	5.32	5.11	3.33	2.22
2	0.422	1.71	3.55	3.77	7.55	5.55	2.22	3.33
$\bar{Y}$	0.516	1.79	3.49	3.82	6.48	5.33	2.78	2.77
ΣY_{ij}^2	0.55	6.46	24.44	29.19	85.30	56.91	16.02	16.02
$\Sigma Y_{j.}$	1.033	3.59	6.99	7.64	12.87	10.66	5.55	5.55

ANOVA

SOV	df	SS	MS
trt	7	49.57	7.08
E	8	3.86	0.48
total	15	53.43	

$S\bar{x} = \sqrt{MS_E/r} = \sqrt{0.48/2}$

$= 0.49$

P	2	3	4	5	6	7	8
SSR	3.26	3.39	3.47	3.52	3.55	3.56	3.56
LSR	1.59	1.66	1.69	1.72	1.74	1.74	1.74

ลำดับค่าเฉลี่ย

ลำดับ	1	2	3	4	5	6	7	8
$\bar{Y}$	0.516	1.79	2.77	2.78	3.48	3.82	5.33	6.48

สรุปการวิเคราะห์

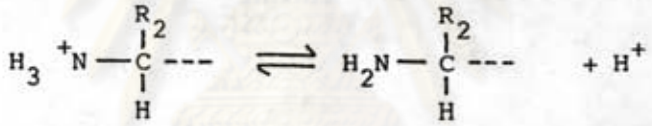
ที่พีเอช 5.5 และ 6.0 จะให้การทำงานของกลูโคอะไมเลสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95%

ภาคผนวก ช

1. <u>การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์</u> (Sejr Olsen et al, 1978), (NOVO, 1977)

เอนไซม์โปรติเอส (endo-peptidase) จะสลายพันธะเปปไตด์ในโปรตีนตามแผนภาพ ดังนี้

ที่พีเอชสูงกว่า 6.5 กรดอะมิโนส่วนมากจะแตกตัวให้ H^+ (dissociation) (ปกติค่า pK ของกรดอัลฟาอะมิโน ในโพลีเปปไตด์จะเท่ากับ 7.5-7.7 ที่ 25°ซ และ 7.0-7.2 ที่ 50°ซ)



พีเอชจะลดลง เพื่อรักษาพีเอชให้สม่ำเสมอระหว่างการย่อย จะต้องเติมเบสอย่างสม่ำเสมอ โดยทั่วไปใช้ NaOH แต่อาจใช้ $Ca(OH)_2$ หรือ NH_3 แทนได้ในบางกรณี เรียกวิธีนี้ว่า pH stat

ที่พีเอชต่ำกว่า 6.5 จะเติมเบสอย่างมาก เพราะโปรตีนมีคุณสมบัติบัฟเฟอร์สูง (high buffer capacity) ช่วยรักษาพีเอชให้ค่อนข้างคงที่ระหว่างการย่อย

2. <u>degree of hydrolysis</u> (DH)

ที่พีเอชคงที่ อัตราส่วนระหว่างพันธะเปปไตด์ และเบสที่ใช้เขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$B = \frac{10^{pH - pK}}{1 + 10^{pH-pK}} n = \alpha \times n \text{ equivalent} \qquad (1)$$

เมื่อ B คือเบสที่ใช้ (สมมูลย์เบส) n คือ จำนวนสมมูลย์ของพันธะเปปไตด์ ที่ถูกสลายที่พีเอช α = pK, = 0.5 ค่า จะเข้าใกล้ 1 เมื่อ pH เพิ่มขึ้นและจะมีค่าเข้าใกล้ 0 เมื่อ pH ลดลง

DH คือ อัตราส่วนระหว่างจำนวนพันธะเปปไตด์ที่ถูกสลายกับพันธะเปปไตด์ทั้งหมดในโปรตีน

$$DH = \frac{\text{number of peptide bonds cleaved}}{\text{total number of peptide bonds}} \times 100 \qquad (2)$$

สำหรับโปรตีนในอาหาร (ยกเว้นเจลาติน) ค่าพันธะเปปไทด์ทั้งหมด ประมาณ 8 สมมูลย์ต่อโปรตีน 1 กก.

เมื่อรวมสมการ (1) และ (2) จะหา DH ได้จากการคำนวณ

$$\% DH = \frac{B}{(\alpha)(m)(n_{tot})} \times 100 \qquad (3)$$

DH คือ เปอร์เซ็นต์ของการย่อย

B คือ จำนวนสมมูลย์ของด่างที่ใช้ไป

m คือ ปริมาณโปรตีนของสับสเตรท (กก.)

n_{tot} คือ จำนวนเปปไทด์บอนด์ทั้งหมด (สำหรับโปรตีนในอาหาร กำหนดให้เท่ากับ 8 สมมูลย์/กก. โปรตีน)

α คือ ค่าคงที่เท่ากับ 0.5 เมื่อ pH = pK

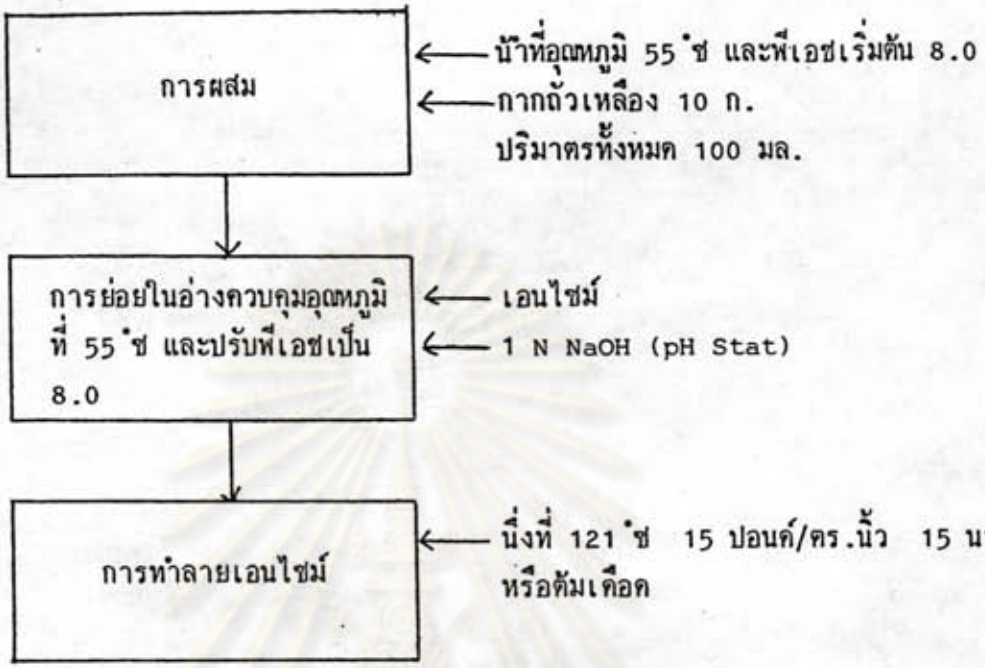
จะมีค่าเข้าใกล้ 1 เมื่อ pH > pK

และมีค่าเข้าใกล้ 0 เมื่อ pH < pK

3. <u>การย่อยโปรตีนในกากถั่วเหลือง และกากรำข้าวด้วยเอนไซม์</u>

3.1 ทำการย่อยโปรตีนในกากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ ย่อยโปรตีนจากแหล่งจุลินทรีย์ ได้แก่ ALCALASE (SUBSILITIN, NOVO) ด้วยอัตราส่วนเอนไซม์/โปรตีน ที่ต่าง ๆ กัน เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสม ควบคุมอุณหภูมิ 55 °ซ ควบคุมปฏิกิริยาแบบ pH stat ตามวิธีการของ NOVO (1977) ด้วยการเติมด่าง 1 N NaOH ทุก ๆ 20 นาที ให้พีเอชกลับมาที่จุดเดิม คือพีเอชเริ่มต้น = 8.0

ขั้นตอนการย่อยโปรตีนมีดังนี้

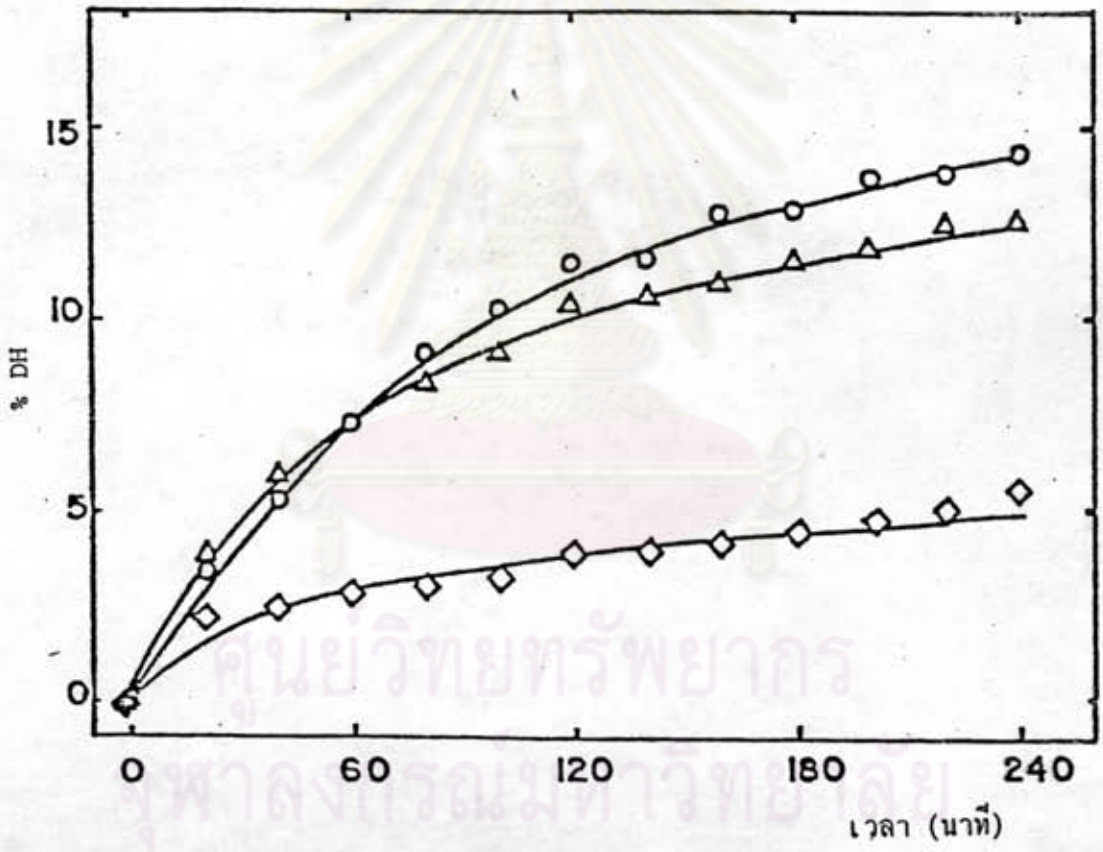


3.2 ทำการย่อยกากถั่วเหลือง และกากรำข้าวด้วย ALCALASE (NOVO) และปาเปน (Merck) สภาพที่ทำการย่อยแตกต่างกันตามชนิดของเอนไซม์ ดังนี้

เอนไซม์ที่ใช้	อัตราส่วนเอนไซม์/โปรตีน %	อุณหภูมิ °ซ	พีเอช
อัลคาเลส	18	55	8.0
ปาเปน	18	37	7.6

ขั้นตอนการย่อยเหมือนข้อ 3.1

ควบคุมปฏิกิริยาโดยการเตรียม 1 N NaOH ทุก ๆ 20 นาที ให้พีเอชกลับมาที่จุดเริ่มต้น หา % ของการย่อย (degree of Hydrolysis) โดยคำนวณจากปริมาณด่างทั้งหมดที่ใช้ไป ตามสูตร 3 (NOVO, 1977)



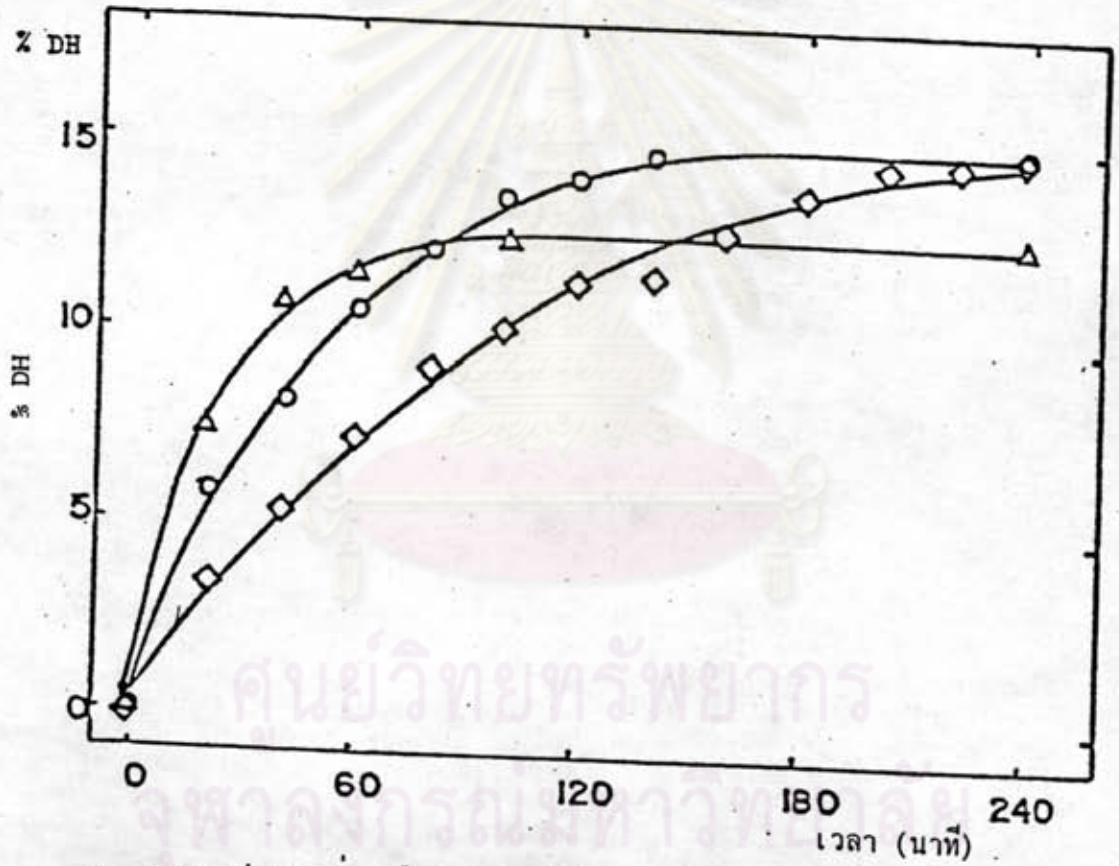
1. ผลการหาอัตราส่วนเอนไซม์/โปรตีนที่เหมาะสม

% DH ที่ได้จากการแปรค่าอัตราส่วนอัลคาเลส 0.6 L (NOVO) และกากถั่วเหลือง

○ = อัตราส่วนเอนไซม์/กากถั่ว 0.8% (เอนไซม์/โปรตีน 18%)

△ = อัตราส่วนเอนไซม์/กากถั่ว 0.9% (เอนไซม์/โปรตีน 20%)

◇ = อัตราส่วนเอนไซม์/กากถั่ว 0.1% (เอนไซม์/โปรตีน 2%)



2. ผลการย่อยกากถั่วเหลืองและกากรำข้าว

% DH เมื่อใช้อัลคาเลส 0.6 L (NOVO) และปาเปน (Merck) ย่อยกากถั่วเหลืองและกากรำข้าว อัตราส่วนเอนไซม์/โปรตีน 18%

△ = กากรำข้าวย่อยด้วยอัลคาเลส

○ = กากถั่วเหลืองย่อยด้วยอัลคาเลส

◇ = กากรำข้าวย่อยด้วยปาเปน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฌ

การคำนวณ dynamic measurement (ดัดแปลงจาก Wang, 1979)

จากสมดุลย์มวลของออกซิเจนที่ละลายในการหมักแบบ batch

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a\,(C^* - C_L) - rX \qquad (1)$$

จากสมการที่ (1)

$$dC_L = k_L a\,(C^* - C_L)dt - rX dt$$

$$dC_L = (k_L aC^* - rX)dt - k_L a\,C_L dt$$

$$\int_{C_{L_o}}^{C_{L_f}} dC_L = (k_L aC^* - rX)\int_{t=o}^{t_f} dt - k_L a \int C_L dt$$

$$(C_{L_f} - C_{L_o}) = (k_L aC^* - rX)\,t_f - k_L a \int C_L dt$$

$$\frac{(C_{L_f} - C_{L_o})}{t_f} = (k_L aC^* - rX) - k_L a\,\frac{C_L}{t_f}\,dt \qquad (2)$$

จากสมการ (2) ถ้าเขียนกราฟระหว่าง $(C_{L_f} - C_{L_o})$ กับ $\int \frac{C_L}{t_f}\,dt$

จะได้ความชัน $= -k_L a$

กราฟตัดแกน Y $= (k_L aC^* - rX)$

เมื่อ $\int \frac{C_L}{t_f}\,dt$ คือพื้นที่ใต้กราฟจากช่วง t_o ถึง t_f

ดังนั้นจึงเขียนกราฟระหว่าง $\frac{(C_{L_f} - C_{L_o})}{t_f}$ กับ $\frac{\text{พื้นที่}}{t_f}$

ประวัติผู้เขียน

นางสาว ดวงกมล วิลาวรรณ เกิดวันที่ 16 มกราคม 2504 ในกรุงเทพมหานคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2524

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย