รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ชุลีพร จูงสาย. 2535. การศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พัชรา วีระกะลัส. 2543.เอนไซม์. กรุงเทพ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วารุณี พานิชผล และ วลัยกานต์ เจียมเจตจรูญ. 2541. ตารางคุณค่าอาหารสัตว์. กลุ่มงานวิเคราะห์อาหารสัตว์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กรุงเทพ.

วันทนา พินัยกุล. 2544. การผลิตอะไมเลสทนร้อนจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในระดับขวดเขย่าและถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง 5 ลิตร. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิริพงษ์ เปรมจิต.2534. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลสและผลิตเอทธานอลที่อยู่ร่วมกับป่านศรนารายณ์ *Agave sisalana* Perrine. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมใจ ศิริโภค. 2544. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพ : บางกอก ซอฟแวร์ เทคโนโลยี.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. สิถิติด้ารการเกษตรของไทย. [Online]. แหล่งที่มา : http://www.oae.go.th/statistic/index.html [5 มีนาคม 2547]

อภิชาติ สนธิสมบัติ. 2545. กระบวนการทางเคมีสิ่งทอ. คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล, ปทุมธานี

อรพิน ภูมิภมร. 2526. จุลินทรีย์ที่สำคัญต่ออุตสาหกรรม การเกษตร สิ่งแวดล้อม : ระบบชีวภาพที่สำคัญต่อเทคโนโลยีชีวภาพ เล่มที่1. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาษาอังกฤษ

Acebal, C., Castillon, M.P., Estrada, P., Mata, I., Costa, E., Aguado, J., Romero, D., and Jimenez, F.1986. Enhanced cellulase production from *Trichoderma reesei* QM 9414 on physically treated wheat straw. Applied Microbiology and Biotechnology. 24 : 218-223.

Awafo, V. A., Chahal, D. S., and Simpson, B. K. 2000. Evaluation of combination treatments of sodium hydroxide and steam explosion for the production of

cellulase-systems by two *T. reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. Bioresource Technology. 73 : 235-245.

Aiello, C., Ferrer, A., and Ledesma, A. 1996. Effect of alkaline treatment at various temperatures on cellulase and biomass production using submerged sugarcane bagasse fermentation with *Trichoderma reesei* QM 9414. Bioresource Technology. 57 : 13-18.

Andreaus, J. and Compos, R. 2000. Influence of cellulases on indigo backstaining. Textile Research Journal. 70(7) : 628-632.

Andreaus, J., Ramos, L. P., and Cavaco-Paulo, A. 2000. Dry action of *Trichoderma reesei* cellulases on cotton fabrics. JSDC. 116 : 121-125.

Aguiar, C. L. 2001. Biodegradation of the cellulose from sugarcane bagasse by fungal cellulase. Cienc Technol. Aliment. (3)2 : 117-121.

Ashadi, R. W., Shimokawa, K., and Ogawa, K. 1996. The mechanism of enzymatic cellulose degradation (II). Mode of action of cellulose hydrolyzing enzyme from *Aspergillus niger* UC. Journal of Genetic and Applied Microbiology. 42 : 103-108.

Azevedo, H., Bishop, D., and Cavaco-Paulo. 2000. Effect of agitation level on the adsorption, desorption, and activities on cotton fabrics of full length and core domains of EGV (*Humicola insolens*) and CenA (*Cellulomonas fimi*). Enzyme and Microbial Technology. 27 : 325-329.

Barnett, H. L. 1967. Illustrated genera of imperfect fungi. 2nd. USA : Burgess Publishing Company.

Bastawde, K. 1992. Cellulolytic enzymes of a thermoterlorant *Aspergillus terreus* strain and their action on cellulosic substrates. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 8 : 45-49.

Baijal, M., Singh, S., Shukla, R. N., Sanwal, G. G. 1972. Enzymes of the banana plant : optimum conditions for extraction. Phytochemistry. 11 : 929-936.

Bigelow, M., and Wyman, C. E. 2002. Cellulase production on bagasse pretreated with hot water. Applied Biochemistry and Biotechnology. 98-100 : 921-934.

Blanchard, E. J., Graves, E. E., and Batiste, S. L. 2000. Enzymatic hydrolysis of modified cotton. Textile Chemist and Colorist and American Dyestuff Reporter. 32(5) : 37-41.

Bok, J., Dienesh, A., Yernool, D., and Eveleigh, D. 1998. Purification,characterization and molecular analysis of thermostable cellulases CelA and CelB from *Thermotoga neapolitana*. Applied Environmental Microbiology. 64 : 4774–4781.

Bungay, H. R. 1981. Fractionation and pretreatment. In Energy,The Biomass Options. USA : John Wiley and Sons, Inc. 185-201.

Buschle-Diller, G., Zeronian, S. H., Pan, N., and Yoon, M. Y. 1997. Enzymatic hydrolysis of cotton linen, ramie and vicose rayon fabrics. Textile Research Journal. 64(5) : 270-279.

Buschle-Diller, G., Walsh, W. K., Reed, I. E., and Radhakrishnaiah, P. 1996. Effect of enzymatic treatment on dyeing and finishing of cellulosic fibers : A study of the basic mechanisms and optimization of the process. National Textile Center Annual Report : Project : 196-1. 49-51.

Buschle-Diller, G., Yang, X. D., and Yamamoto, R. 2001. Enzymatic bleaching of cotton fabric with glucose oxidase. Textile Research Journal. 71(5) : 388-394.

Busto, M. D., Ortega, N., and Mateos-Perez, M. 1996. Location, kinetics and stability of cellulases induced in *Trichoderma reesei* cultures. Bioresource Technology. 57 : 187-192.

Busto, M. D., Ortega, N., and Perez-Mateos, M. 1997. Stabilisation of cellulases by cross- linking with glutaraldehyde and soil humates. Bioresource Technology. 60 : 27-33.

Buswell, J.A. 1991. Fungal degradation of lignin. In Arora, D.K., Rai, B. Mukerji, K.G., and Knudsen, G.R. (eds.). Handbook of Applied Mycology. Vol.1: Soil and Plants. New York, USA.: Marcel Dekker. 1: 425-480.

Castellanos, O. F., Sinitsyn, A. P., and Vlasenko, E. Y. 1995. Comparative evaluation of hydrolytic efficiency toward microcrystalline cellulose of *Penicillium* and *Trichoderma* cellulases. Bioresource Technology. 52 : 119-124.

Chang, V. S., and Holtzapple, M. T. 2000. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reaction. Applied Biochemistry and Biotechnology. 84-86.

Chaplin, M. F., and Kennedy, J. F. 1994. Carbohydrate analysis. 2nd. New York : Oxford University Press.

Chen, S., and Wayman, M. 1991. Cellulase production induced by carbon sources derived from waste newspaper. Process Biochemistry. 26 : 93-100.

Choe, E. K., Park, S. Y., Cha, H. C., and Jeon, B. D. 1997. Effect of pre-existing dyes and fabric type on cellulase treatment of cotton fabrics(FN1). Textile Research Journal. 67 : 155-162.

Christakopoulos, P., Mamma, D., Nerinckx, W., Kekos, D., Macris, B., and Claeyssens, M. 1996. Production and partial characterization of xylanase from *Fusarium oxysporum*. Bioresource Technology. 58 : 115-119.

Compos, R., Cavaco-Paulo, A., Andreaus, J., and Gubitz, G. 2000. Indigo-cellulase interactions. Textile Research Journal. 70(6) : 532-536.

Coral, G., Akikan, B., unaldi, M. N., and Guvenmez, H. 2002. Some properties of crude carboxymethyl cellulase of *Aspergillus niger* Z10 wild-type strain. Turk Journal of Biology. 26 : 209-213.

Cordeiro, N., Belgacem, M. N., Torres, I. C., and Moura. 2004. Chemical composition and pulping of banana pseudo-stems. Industrial Crops and Products. 19 : 147-154.

Cossar, D., and Canevascini, G. 1986. Cellulase enzyme production during continuous culture growth of *Sporotricum* (*Chrysosporium*) thermophile. Applied Microbiology and Biotechnology. 24 : 306-310.

Dahot, M. U., and Noomrio, M. H. 1996. Microbial production of cellulases by *Aspergillus fumigatus* using wheat straw as a carbon source. Journal of Islamic Academy of Sciences. 9(4) : 1-7.

Dijkerman, R., Op den Camp, H. J. M., and Van der Drift, C. 1996. Cultivation of anaerobic fungi in a 10-l fermenter system for the production of (hemi-)cellulolytic enzymes. Applied Microbiology and Biotechnology. 46 : 85-91.

Domingues, F. C., Queiroz, J. A, Cabral, J. M. S., and Fonseca, L. P. 2000. The influence of culture conditions on myclial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. Enzyme and Microbial Technology. 26 : 394-401.

Elshafei, A. M., Vega, J. L., Klasson, K. T., Clausen, E. C., and Gaddy, J. L. 1990. Cellulase and hemicellulase formation by fungi using corn stover as the substrate. Biological Wastes. 32 : 209-218.

Ericksson, K. E. L., Blanchette, R. A., and Ander, P. 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Berlin, Germany : Ozach Gmbh and Co.. 181-222.

Estrada, P., Acebal, C., Castillan, M.P., Mata, I., and Romero, A. 1988. Adsorption of cellulase from *Trichoderma reesei* on wheat straw. Biotechnology and applied Biochemistry. 10 : 49-58.

Evans, C. 1985. Properties of the β-D-glucosidase (cellobiase) from the wood-rotting fungus, *Coriolus versicolor*. Applied Microbiology and Biotechnology. 22 : 128-131.

Freire, S. V. P., da Silva, M. P. C., de Luna-Alves Lima, E. A., Maia, L. C., and Kennedy, J. F. 1999. Production of endo-1,4-β-D-glucanase by *Curvularia pallescens*. Carbohydrate polymer. 39 : 61-65.

Ghose, T. K., 1987. Measurement of cellulase activities. International Union of Pure and Applied Chemistry. 59 : 257-268.

Ghose, T. K., and Bisaria. 1987. Measurement of Hemicellulase actvities Part 1: Xylanases. Pure and Applied Chemistry. 59(2) : 1739-1752.

Griffin, H. D. 1994. Fungal Physiology. 2nd ed. New York: Wiley-Liss; 458 pp.

George, S. P., Ahmad, A., and Rao, M. B. 2001. Studies on carboxymethyl cellulase produced by an alkalothermophilic actinomycete. Bioresource Technology. 77 : 171-175

Goering, T. K., and Van Soest, P. J. 1970. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagent, Producers and Some Applications). Agriculture Handbook NO. 379. United Stated Department of Agriculture. Washington, D. C. 20402, U.S.A. 20p.

Gomes, I., Gomes, J., Steiner, W., and Esterbauer, H. 1992. Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*. Applied Microbiology and Biotechnology. 36 : 701-707.

Gomes, I., Gomes, J., Gomes, D. J., and Steiner, W. 2000. Simultaneous production of high activities of thermostable endoglucanase and β-glucosidase by the wild

thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. Applied Microbiology and Biotechnology. 53 : 461-468.

Gornall, A. G., Bardawill, C. J., and David, M. M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. Journal of Biological Chemistry. 177; 751.

Grajek, W. 1987. Comparative studies on the production of cellulases by thermophilic fungi in submerged and solid-state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology. 26 : 126-129.

Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K., Steiner, W., and Zupancic, S. 1996. Production of fungal xylanases. Bioresource Technology. 58 : 137-161.

Hankin, L., and Anagnostakis, S.L. 1977. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulase activity of microorganism. Journal of General Microbiology. 98 : 109-115.

Han, Y. D., and Woodams, E. E. 2001. Enzymatic production of reducing sugars from corn cobs. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 34 : 140-142.

Hart, T.D., Lynch, J.M., and De Leij, F.A.A.M. 2003. Production of *Trichurus spiralis* to enhance the composting. Enzyme and Microbial Technology 32 : 745–750

Hartzell, M., M., and Hsieh, You-Lo. 1998. Enzymatic scouring to improve cotton fabric wettability. Textile Research Journal. 68(4) : 233-241.

Heikinheimo, L., and Buchert, J. 2001. Synergistic effects of *Trichoderma reesei* cellulases on the properties of knitted cotoon fabric. Textile Research Journal. 71(8) : 672-677.

Hirayama, T., Horie, S., Nagayama, H., and Matsuda, K. 1978. Studies on cellulases of a phytopathogenic fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara. Journal of Biochemistry. 84 : 27-37.

Hollen, N., Sadler, J., and Langford, A. L. 1979. Textiles. fifth edition. USA : Macmillan Publishing Co.

Horwitz, W. 2000. Official methods of analysis of AOAC international Volumn II. (Food Composition; Additive; Natural Contaminants). Seventeenth edition. Maryland: AOAC international.

Hrmova, M., Biely, P., and Vrsanska, M. 1989. Cellulose- and xylan-degraing enzymes of *Aspergillus terreus* and *Aspergillus niger*. Enzyme and Microbial Technology. 11 : 610-616.

Jecu, L. 2000. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. Industrial Crops and Products. 11 : 1-5.

Jin, C., and Maekawa, M. 2001. Evaluating an enzyme treatment of ramie fabrics. Textile Research Journal. 71(9) : 779-782.

Jorgensen, H., Eriksson, T., Borjesson, J., Tjemeld, F., and Olsson, L. 2003. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. Enzyme and Microbial Technology. 32 : 851–861.

Juhasz, T., Kozma, K., Szengyel, Z., and Recey, K. 2003. production of β-glucosidase in mixed culture of *Aspergillus niger* BKMF 1305 and *Trichoderma reesei* RUT C30. Food Technology and Biotechnology. 41(1) : 49-53.

Kaar, W. E., and Holtzapple, M.T. 2000. Using lime pretreatment to facilitate the enzymic hydrolysis of corn stover. Biomass and Bioenergy. 18 : 189-199.

Kader, A. J., and Omar, O. 1998. Isolation of cellulolytic fungi from Sayap-Kinabalu park, Sabah. ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC). Article II : 1-6.

Kalra, M. K., Sidhu, M. S., Dandhu, D. K., and Sandhu, R. S. 1984. Production and regulation of cellulases in *Trichoderma hazianum*. Appled Microbiology and Biotechnolology. 20 : 427-429.

Kanda, T., Nakakubo, S., Wakabayashi, K., and Nisizawa, K. 1978. Purification and properties of an exo-cellulase of avicelase type from a wood-rotting fungus, *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*). Journal of Biochemistry. 84 : 1217-1226.

Kang, S. W., Park, Y. S., Lee, J. S., Hong, S. I., and Kim, S. W. 2004. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. Bioresource Technology. 91 : 153-156.

Kanana, K., Oblisami, G., and Loganathan, B. G. 1990. Enzymology of ligno-cellulose degradation by *Pleurotus sajor-caju* during growth on paper-mill sludge. Biological Wastes. 33 : 1-8.

Karlsson, J. 2000. Study of hydrolytic properties of endoglucanases from *Trichoderma reesei* and *Humicola insolens.* Fungal cellulases. Department of Biochemistry ,Lund University, Sweden.

Kawamori, M., Morika, Y., Ado, Y., and Takasawa, S. 1986. Production of cellulases from alkali-treated bagasse in *Trichoderma reesei.* Applied Microbiology and Biotechnology. 24 : 54-458.

Kengen, S., Luesink, E., Stams, A., and Zehnder, A. 1993. Purification and characterization of an extremely thermostable β-glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococccus furiosus.* European Journal of Biochemistry. 213 : 305–312.

Kim, D. W., Yang, J. H. Y., And Jeong, Y. K. 1988. Adsorption of cellulase from *Trichoderma viride* on microcrystalline cellulose. Applied Microbiology and Biotechnology. 28 : 148-154.

Klich, M. A., and Pitt, J. I. 1988. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their telemorphs. CSIRO Divsion of Food Processing, North Ryde, N. S. W. Australia.

Krikstaponis, A., Lugauskas, A., Krysinska-Traczyk, E., Prazmo, Z., and Dutkiewicz, J. 2001. Enzymatic activities of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from the air at waste landfills. Ann Agric Environ Med. 8 : 227-234.

Krishna, C. 1999. Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. Bioresource Technology. 69 : 231-239.

Krisha, H. S., Rao, S. K. C., Babu, S. J., and Reddy, S. D. 1999. Studies on the production and application of cellulase from *Trichoderma reesei* QM 9414.Department of Botany, University of Auxin, USA.

Krishna, S. H., Prasanthi, K., Chowdary G. V., and Ayyanna, C. 1998. Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated sugar cane leaves to ethanol. Process Biochemistry. 33(8) : 825-830.

Krishna, S. H., Rao, K. C. S., Babu, S., and Reddy, D. S. 2000. Studies on the production and application of cellulase from *Trichoderma reesei* QM-9414. Bioprocess Engineering. 22 : 467-470.

Kvesitadze, E., Adeishvili, E., Gomarteli, M., Kvachadze, K., and Kvesitadze, G. 1999. Cellulase and xylanase activity of fungi in a collection isolated from the southern Caucasus. International Biodeterioration and Biodegradation. 43 : 189-196.

Li, Y., and Hardin, I. R. 1997. Enzymatic scouring of cotton: Effects on structure and properties. Textile Chemist and Colorist. 29(8) : 71-76.

Li, Y., and Hardin, I. R. 1998. Enzymatic scouring of cotton surfactants, agitation and selection of enzymes. Textile Chemist and Colorist. 30(9) : 23-28.

Limtong, P., Vangnai, S., Sunanthapongsuk, V., and Piriyaprin, S. 1990. Isolation and selection of thermophilic cellulolytic microorganisms for compost production in Thailand. Kasetsart Journal of Natural Science. 24 : 108-115.

Macris, B. J., Kekos, D., and Evangelidou, X. 1989. A simple and inexpensive method for cellulose and β-glucosidase by *Neurospora crassa*. Applied Microbiology and Biotechnology. 31 : 150-151.

Maheswari, D. K., Jahan, H., Paul, J., and Varma, A. 1993. Wheat straw, a potential substrate for cellulase production using *Trichoderma reesei*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 9 : 120-121.

Malhotra, R., Noorwez, S. M., and Satyanarayana, T. 2000. Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent α-amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovarans* NP 54. Letters in Applied Microbiology. 31 : 378-384.

Mandel, M., and Reese, E. T. 1999. Fungal cellulases and the microbial decomposition of cellulosic fabric. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 22 : 225-240.

Mandels, M., and Sternberg, D. 1976. Recent advance in cellulose technology. Journal of Fermentation Technology. 54(4) : 276-268.

Mawadza, C., Hatti-Kaul, R., Zvauya, R., and Mattiasson, B. 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. Journal of Biotechnology. 83 : 177–187.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analysis of chemistry. 31 : 426-428.

Mizukoshi, S., Sugi, H., Mori, H., and Ichihashi, M. 1977. Production of cellulase from *Pellicularia filamentosa*. Fermentation Technology. 55(5) : 548-552.

Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. Journal of Biological Chemistry. 153 : 375-380.

Ortega, N., Busto, M. D., and Perez-Mateos, M. 2000. Enzymatic saccharification of pretreated wheat staw by *T. reesei* cellulase and *A. niger* β-glucosidase. Biocatalysis and Biotrasformation. 18 : 311-330.

Ortega, N., Busto, M. D., and Perez-Mateos, M. 2001. Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases. International Biodeterioration and Biodegradation. 47 : 7-14.

Prasertsan, P., and Oi, S. 1992. Production of cellulolytic enzymes from fungi and use in the saccharification of palm cake and palm fiber. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 8 : 536-538.

Punnapayak, H. 1980.Extracellular material from Staphylococcus aureus and effects upon Staphylococcal phage. M.S. Thesis. The University of Southwestern Louisiana, Louisiana, USA.

Punnapayak, H., and Hoffman, J.J. 1994. *Amsonia* spp. as potential fuel crops for arid land. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 10 : 290-292.

Punnapayak, H., Kuhirun, M., and Thanonkeo, P.1999. Cellulolytic fungi and the bioconversion of fiber from *Agave sisalana*. Science Asia. 25 : 133 -136.

Razak, A. A., Bachmann, G., Ali, Th. M., and Farrag, R. 1999. Activities of microflora in soils of upper and lower Egypt. The Affrican Journal of Mycology and Biotechnology. 7(1) : 1-19.

Rao, M. N.A., and Mithal, B. M. 1983. Productions of cellulase from *Pestalotiopsis versicolor*. Biotechnology and Bioengineering. 25 : 2395-2398.

Ratto, M., Ritschkoff, A. C., and Viikari, L. 1997. The effect of oxidative pretreatment on cellulose degradation by *Poria placenta* and *Trichoderma reesei* cellulases. 1997. Applied Microbiology and Biotechnology. 48 : 53-57.

Reczey, K., Szengyel, Zs., Eklund, R. and Zacchi, G. 1996. Cellulase production by *T. reesei*. Bioresource Technology. 57 : 25-30.

Reddy, G. V., Babu, P. R., Komaraiah, P., Roy, K. R. R. M., and Kothari, I. L. 2003. Utilization of banana waste for the production of ligninolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). Process Biochemistry. 38 : 1457-1462.

Saddler, J. N., Hogan, C. M., and Louis-Seize, G. 1985. A comparision between the cellulase systems of *Trichoderma harzianum* E58 and *Trichoderma reesei* C30. Applied Microbiology and Biotechnology. 22 : 139-145.

Sangwatanaroj, U., Choonukulpong, K., and Ueda, M. 2003. Cotton scouring with pectinase and lipase/protease/cellulase. *AATCC REVIEW*. 3(5) : 17-20.

Sarkar, A. K., and Etters, J. N. 2001. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose. AATCC review. 48-52.

Sharma, S. K., Kalra, K. L., and Grewal, H. S. 2002. Fermentation of enzymatically saccharified sunflower stalks for ethanol production and its scale up. Bioresource Technology. 85 : 31–33.

Simmonds, N. W. 1959. Bananas. London : Longmans, Green and Co Ltd.

Smits, J. P., Rinzema, A., Tramper, J., Van Sonsbeek, H. M., and Knol, W. 1996. Solid-state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM 9414:substrate composition changes, C balance, enzyme production, growth and kinetics. Appled Microbiology and Biotechnolology. 46 : 489- 496.

Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. Journal of Biological Chemistry. 195:19-23.

Sreenath, H. K., Shah, A. B., Yang, V. W., Gharia, M. M., and Jeffries, T. W. 1996. Enzymatic polishing of jute/cotton blended fabrics. Journal of Fermentation and Bioengineering. 81(1) : 18-20.

Sreenath, H. K., Yang, V. W., Burdsall, H. H. Jr., and Jeffries, T. W. 1996. Toner removal by alkaline-active cellulases from desert basidiomycetes. 211th ACS national meeting of the cellulose, paper, and textile division. USA. 267-279.

Sterberg, D., Vijayakumar, P., and Reese, E. T. 1977. β-Glucosidase : microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. Canadian of Journal of Microbiology 23 : 139-147.

Sun, Y., and Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresource Technology. 83 : 1–11.

Suto, M., and Tomiya, F. 2001. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. Journal of Bioscience and Bioengineering. 92(4) : 305-311.

Suyama, K., Hiroki, Y., Takahiko, N., Takashi, I., and Hajimu, K. 1993. A plate count method for aerobic cellulose decomposers in soil by congo red staining. Soil sci. Plant Nutr.39(2) : 361–365.

Szengyel, Z., and Zacchi, G. 2000. Effect of acetic acid and furfural on cellulase production of *Trichoderma reesei* Rut C30. Applied Biochemistry and Biotechnology. 89 : 31-42.

Tahoun, M. K., and Ibrahim, A. 1999. Conversion of natural cellulosic substrates into fermentable sugar by recombinant fungi strains. Z Lebensm Unters Forsch A. 208 : 65-68.

Takagaki, K., Kon, A., Kawasaki, H., Kakamura, T., Tamura, S., and Endo, M. 1990. Isolation and characterization of Patnopecten sp. Mid-gut gland endo β-xylosidase active on peptidochondrotinsulfate. Journal of Biological Chemistry. 565(2) : 854-860.

Tolan, J. S., and Foody, B. 1999. Cellulase from submerged fermentation. Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology. 65 : 42-67.

Thirumale, S., Rani, D. S., and Nand, K. 2001. Control of cellulase formation by trehalose in *Clostridium papyrosolvens* CFR-703. Process Biochemistry. 37 : 241-245.

Vlasenko, E. Y., Ding, H., Labavitch, J. M., and Shoemaker, S. P. 1997. Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. Bioresource Technology. 59 : 109-119.

Vlaev, S. D., Djejeva, G., Raykovska, V., and Schugerl, K. 1997. Cellulase production by *Trichoderma* sp. Grown on corn fibre substrate. Process Biochemistry. 32(7) : 561-565.

Voet, D., and Voet, J. G. 1995. Biochemistry. 2nd Ed. New York : John wiley and sons.

Xiao-Bin, Y., Yun, H. S., and Koo, Y. 1998. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* Rut C30 in wheat bran-containing media. Journal of Microbiology and Biotechnology. 8(3) : 208-213.

Xiao-Bin, Y., Yun, H. S., and Koo, Y-M. 1999. Cellulase production in fed-batch culture by *Trichoderma reesei* Rut C30. Journal of Microbiology and Biotechnology. 9(1) : 44-49.

Ximenes, E. A., Felix, C. R., and Ulhoa, C. J. 1996. Production of cellulases by *Aspergillus fumigatus* and characterization of one β-glucosidase. Current Mcrobiology. 32 : 119-123.

Wakida, T., Moriya, T., Lee, M., Yoshioka, H., and Yanai, Y. 2000. Effect of liquid ammonia, sodium hydroxide/liquid ammonia, and subsequent cellulase treatments on the mechanical properties of cotton fabric. Textile Research Journal. 70(2) : 161-165.

Wayman, M., Chenm, S., and Doan, K. 1992. Bioconversion of waste paper to ethanol Process Biochemistry. 27 : 239-245.

Wike, C. R., Maiorella, B., Sciamanna, A., Tangnu, K., Wiley, D., and Wong, H. 1983. Enzymatic hydrolysis of cellulose. Park Ridge, New Jersey, USA : Noyes Data Corporation.

Wojtezak, G., Breuil, C., Yamada, J., and Saddler, J. N. 1987. A comparison of the thermostability of cellulases from various thermophilic fungi. Applied Microbiology and Biotechnology. 27 : 82-87.

Yachmenev, V. G., Blanchard, E. J., and Lambert, A. H. 1999. Study of the influence of ultrasound on enzymatic treatment of cotton fabric. Textile Chemist and Colorist and American Dyestuff Reporter. 1(1) : 47-51.

Yamanobe, T., Mitsuishi, Y., and Takasaki. 1987. Isolation of cellulolytic enzyme producing microorganism, culture conditions and some properties of the enzymes. Agricultural of Biological Chemistry. 51(1) : 65-74.

Yamagata, Y., Yachi, M., Kurasawa, T., Suto, M., Sasaki, H., Takao, S., and Tomita, F. 1991. Cellulase induction by celloiose-octaacetate in *Penicillium purpurogenum*. Journal of Fermntation and Bioengineering. 72(3) : 217-220.

Zacchi, L., Burla, G., Zoulong, D., and Harvey, P.J. 2000. Metabolism of cellulose by *Phanerochaete chrysosporium* in continuously agitated culture is associated withenhanced production of lignin peroxidase. Journal of Biotechnology. 78 : 185-192.

Zaldivar, M., Velasquez, J. C., Contreras, I., and Perez, L. M. 2001. *Trichoderma aureoviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes : its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. Electronic Journal of Biotechnology. 4(3) : 160-168.

Zverlov, V., Riedel, K., and Bronnenmeier, K., 1998. Properties and gene structure of a bifunctional cellulytic enzyme (CelA) from the extreme thermophile *Anaerocellum thermophilum* with separateglycosyl hydrolase family 9 and 48 catalytic domains. Microbiology. 144 : 457–465.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัย

1. Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเดกโตรส (Dextrose)	20	กรัม
วุ้นผง (Agar)	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีการเตรียม

1.1 นำมันฝรั่งปอกเปลือก ล้างให้สะอาด และนำมาหั่นเป็นรูปสี่เหลี่ยมจตุรัสชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 200 กรัม นำไปต้มในน้ำกลั่นประมาณ 700 มิลลิลิตรเพื่อให้สุก สังเกตได้จากการใช้มือบีบแล้วมันฝรั่งนุ่มแตกออกง่าย ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

1.2 นำมากรองแต่ส่วนน้ำ เติมน้ำตาลเดกโตรส 20 กรัม ลงไปผสมให้ละลาย เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อยให้มีปริมาตรของอาหารประมาณ 900 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดและด่างให้อยู่ในช่วง 5.0 – 5.5 ด้วย HCl 1 นอร์มอล หรือ NaOH 1 นอร์มอล

1.3 เติมวุ้นผง 20 กรัม และนำไปต้มให้วุ้นละลาย ปรับปริมาตรสุดท้ายของอาหารให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Carboxymethyl cellulose agar (CMC agar) (Hankin and Anagnostakis ,1977)

Carboxymethyl cellulose	5.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	1.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
วุ้นผง (Agar)	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลาย Carboxymethyl cellulose 5.0 กรัม ในน้ำร้อนประมาณ 500 มิลลิลิตร โดยค่อยๆ ใส่พร้อมกับคนให้ละลายจนหมด เติมส่วนประกอบที่เหลือและปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Czapex' s dox medium (Mandel and Sternberg, 1976)

$(NH_4)_2SO_4$	1.0	กรัม
KH_2PO_4	2.0	กรัม
Urea	0.3	กรัม
$CaCl_2$	0.3	กรัม
$MgSO_4$	0.3	กรัม
$FeSO_4$	5.0	มิลลิกรัม
$MnSO_4$	1.6	มิลลิกรัม
$ZnSO_4$	1.4	มิลลิกรัม
$CoCl_2$	2.0	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และนำไปใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรอาหารเท่ากับ 100 มิลลิลิตร จากนั้นใส่กระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดกว้าง 2.0 X 10.0 เซนติเมตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Production medium (Punnapayak *et al.*, 1999)

$MgSO_4$	1.0	กรัม
Corn steep liquor	7.0	กรัม
$CaHPO_4$	5.0	กรัม
α-cellulose	30.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	4.0	กรัม
$FeSO_4$	5.0	มิลลิกรัม
$ZnSO_4$	1.4	มิลลิกรัม
$MnSO_4$	1.6	มิลลิกรัม
$CoCl_2$	3.6	มิลลิกรัม
Tween 80	2.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้น $CaHPO_4$ และ α-cellulose เนื่องจากไม่ละลายน้ำ และ Tween 80 แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรใกล้ 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดและด่างให้เท่ากับ 5.0 ด้วย HCl 1 นอร์มอล หรือ NaOH 1 นอร์มอล แล้วจึงเติม Tween 80 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ $CaHPO_4$ และ α-cellulose ไม่ละลายน้ำ ต้องแบ่งชั่งใส่ภาชนะไว้ก่อน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

การเตรียม 0.1 M Sodium Citrate

ชั่ง Tri-sodium Citrate dihydrate ($C_6H_5O_7Na_3.2H_2O$) จำนวน 29.41 กรัม ละลายน้ำและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

การเตรียม 0.1 M Citric acid

ชั่ง Citric acid monohydrate ($C_6H_2O_7.2H_2O$) จำนวน 21.01 กรัม ละลายน้ำและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

การเตรียม 0.025 M Citrate buffer pH 4.5

ชั่ง Tri-sodium Citrate dihydrate ($C_6H_5O_7Na_3.2H_2O$) จำนวน 1.3036 กรัม มาละลายใน น้ำกลั่น 490 มิลลิลิตร แล้วเติม Citric acid monohydrate ($C_6H_2O_7.2H_2O$) ลงไป 1.6953 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 4.5 เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

การเตรียม 0.05 M Citrate buffer pH 4.8

ชั่ง Tri-sodium Citrate dihydrate ($C_6H_5O_7Na_3.2H_2O$) จำนวน 7.6466 กรัม มาละลายใน น้ำกลั่น 990 มิลลิลิตร แล้วเติม Citric acid monchydrate ($C_6H_2O_7.2H_2O$) ลงไป 5.0434 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 4.8 เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

การเตรียม 0.05 M Citrate buffer pH 4.0

นำ 0.1 M Citric acid มา 59 มิลลิลิตร ผสมรวมกับ 0.1 M Sodium Citrate จำนวน 41 มิลลิลิตรจะได้สารละลาย 0.1 M Citrate buffer pH 4.0 จากนั้นจึงทำการเจือจางลง 2 เท่าด้วยน้ำกลั่น

การเตรียม 0.2 M NaH_2PO_4

ชั่ง $NaH_2PO_4.2H_2O$ จำนวน 15.60 กรัม เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียม 0.2 M Na_2HPO_4

ชั่ง $Na_2HPO_4.2H_2O$ จำนวน 15.60 กรัม เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

การเตรียม 0.2 M Sodium phosphate buffer pH 6.0

นำ 0.2 M NaH_2PO_4 มา 87.7 มิลลิลิตร ผสมรวมกับ 0.2 M Na_2HPO_4 จำนวน 12.3 มิลลิลิตร

การเตรียม 0.2 M Sodium phosphate buffer pH 7.0

นำ 0.2 M NaH_2PO_4 มา 39 มิลลิลิตร ผสมรวมกับ 0.2 M Na_2HPO_4 จำนวน 61 มิลลิลิตร

การเตรียม 20 mM Sodium acetate

ชั่ง Sodium acetate trihydrate ($CH_3COONa.3H_2O$) จำนวน 2.721 กรัม ละลายน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

การเตรียม 20 mM Acetic acid

ตวง Acetic acid ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

การเตรียม 20 mM Sodium acetate buffer pH 5.0

นำ 20 mM Sodium acetate มาผสมรวมกับ 20 mM Acetic acid ในอัตราส่วน 70 ต่อ 30 โดยปริมาตร

2. **การเตรียมสารละลาย** Dinitrosalicylic acid (DNS) (**ดัดแปลงจาก** Miller, 1959)

2.1 เตรียมสารละลาย Dinitrosalicylic acid 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 880 มิลลิลิตร

2.2 ชั่ง Potassium sodium tartrate ($NaKC_4H_4O_6.4H_2O$) จำนวน 255 กรัม ละลายในสารละลาย NaOH 4.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

2.3 เตรียมสารละลาย NaOH 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 22 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลาย phenol 10 กรัม เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน เทแบ่งออกมา 69 มิลลิลิตร ใส่ $NaHSO_3$ 6.9 มิลลิลิตร

2.4 ผสมสารละลายจากข้อ 2.1 และ 2.2 ให้เข้ากัน จากนั้นจึงใส่สารละลายข้อ 2.3 ผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บใส่ขวดสีชา และเก็บไว้ในตู้เย็นอย่างน้อย 1 คืนก่อนนำมาใช้

4. การเตรียมสารละลาย Biuret (Gornall *et al.*,1949)

4.1 ชั่ง $CuSO_4.5H_2O$ จำนวน1.50 กรัม และ Potassium sodium tartrate จำนวน 6.0 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

4.2 เตรียมสารละลาย NaOH 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

4.3 นำสารละลายจากข้อ 4.1 และ 4.2 มาผสมรวมกัน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ในขวดสีชา

3. การเตรียมสารละลายสำหรับวัดแอคติวิตีไซแลนเนส (Nelson,1944;Somogyi,1952)

3.1 **การเตรียม** Alkali copper reagent

สารละลาย ก

Na_2CO_3	25 กรัม
Potassium sodium tartrate ($NaKC_4H_4O_6.4H_2O$)	25 กรัม
$NaHCO_3$	20 กรัม
Na_2SO_4	200 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ละลายสารเคมีทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร

สารละลาย ข

ชั่ง $CuSO_4.5H_2O$ จำนวน 15.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไป 2 หยด

สารละลาย Alkali copper reagent

เตรียมโดยผสมสารละลาย ก ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และ สารละลาย ข ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

3.2 **การเตรียม** Arsenomolybdate reagent

ชั่ง Ammonium molybdate 25.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 450 มิลลิลิตร จากนั้นค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 21 มิลลิลิตร ลงไป แล้วจึงเติม $Na_2HAsO_4.7H_2O$ ที่ละลายอยู่ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา และตั้งทิ้งไว้ 2 วันก่อนนำมาใช้

5. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส

5.1 การเตรียมสารละลาย Neutral Detergent

Sodium lauryl sulphate	30	กรัม
Disodium ethylenediamine tetraacetate (EDTA) dihydrate	16.18	กรัม
Sodium borate decahydrate ($Na_2B_4O_7 \cdot 10\ H_2O$)	6.81	กรัม
Na_2HPO_4	4.56	กรัม
2-Ethoxyethanol (ethylene glycol monoethyl ether)	10	มิลลิลิตร

นำ EDTA และ $Na_2B_4O_7 \cdot 10\ H_2O$ มาละลายในน้ำกลั่นพอประมาณ และนำไปต้มจนละลายหมด แล้วนำไปผสมกับ Sodium lauryl sulphate และ 2-Ethoxyethanol

จากนั้นนำ Na_2HPO_4 มาละลายในน้ำกลั่นพอประมาณ และนำไปต้มจนละลายหมดแล้วนำไปผสมกับสารละลายข้างต้น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และ pH อยู่ในช่วง 6.9 -7.1

5.2 การเตรียมสารละลาย Acid Detergent

Sulfuric acid (%assay=100)	49.04	กรัม
Cetyl trimethylammonium bromide	20	กรัม

นำกรดซัลฟูริคใส่ใน Volumetric flask ขนาด 1 ลิตร ที่มีน้ำกลั่นอยู่พอประมาณ ผสม ให้เข้ากัน และปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ตรวจความเข้มข้นของสารละลายด้วยวิธีการไตเตรท ให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1 N แล้วเติม Cetyl trimethylammonium bromide ผสมให้เข้ากัน

5.3 การเตรียมสารละลาย Saturated potassium permanganate

$KMnO_4$	50	กรัม
Ag_2SO_4	0.05	กรัม

ละลาย $KMnO_4$ และ Ag_2SO_4 ในน้ำกลั่น 1 ลิตร แล้วเก็บสารละลายไว้ในขวดแก้วสีชา เก็บไว้ในตู้เย็น อย่าให้โดนแสง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.4 การเตรียมสารละลาย Lignin buffer

$Fe(NO_3)_3.9\ H_2O$	6	กรัม
$AgNO_3$	0.15	กรัม
Potassium acetate	5	กรัม
Acetic acid glacial	500	มิลลิลิตร
Tertiary butyl alcohol	400	มิลลิลิตร

ละลาย $Fe(NO_3)_3.9\ H_2O$ และ $AgNO_3$ ในน้ำกลั่น แล้วนำไปผสมกับ Acetic acid และ Potassium acetate แล้วเติม Tertiary butyl alcohol ผสมให้เข้ากัน

5.5 การเตรียมสารละลาย Combined permanganate

ผสม Saturated potassium permanganate กับ Lignin buffer ในอัตราส่วน 2:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เตรียมใหม่ก่อนใช้ โดยเก็บไว้ได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์ ในตู้เย็นและไม่ให้ถูกแสง ถ้าสารกลายเป็นสีแดงจะใช้ไม่ได้

5.6 การเตรียมสารสะลาย Demineralizing

Oxalic acid dehydrate	50	กรัม
95% Ethanol	700	มิลลิลิตร
HCl	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	250	มิลลิลิตร

ละลาย Oxalic acid ใน ethanol แล้วเติม HCl และน้ำกลั่น ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน

6. การวิเคราะห์หา Acid Detergent Fiber (ADF)

6.1 นำครูซิเบิล (Fritted glass crucible) ที่ล้างสะอาดแล้วไปอบในตู้อบแห้ง (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเอาออกใส่ในโถอบแห้ง (Desiccator) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปชั่งน้ำหนัก

6.2 นำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ทำให้แห้งและบดละเอียดขนาดประมาณ 20 -30 mesh หรือ 1 มิลลิเมตร จำนวน 0.5 ถึง 1.0 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ทรงสูงขนาด 600 มิลลิลิตร เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์เยื่อใย

6.3 เติมสารละลาย Acid Detergent Fiber (ADF) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ Decahydronaphthalene 2 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำไปต้มให้เดือด แล้วปรับอุณหภูมิให้ลดลงเล็กน้อย จากนั้นจึง Reflux ต่อไปเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเริ่มนับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด

6.4 ถ่ายสารละลายและตัวอย่างที่ต้องการทดสอบทั้งหมดที่อยู่ในบีกเกอร์ ลงในครูซิเบิลที่วางอยู่บนชุดกรอง แล้วทำการล้างตัวอย่างที่ติดอยู่ในครูซิเบิล ด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 90 ถึง 100 องศาเซลเซียส ประมาณ 1200 มิลลิลิตร หรือจนกว่าจะไล่สารละลาย Acid Detergent Fiber (ADF) ออกจนหมด

6.5 ล้างตัวอย่างที่ต้องการทดสอบที่ติดอยู่ในครูซิเบิลอีกครั้งด้วย Acetone 2 ถึง 3 ครั้ง หรือจนกระทั่งสารละลายที่ไหลออกจากครูซิเบิลไม่มีสี

6.6 นำครูซิเบิลไปอบในตู้อบแห้ง (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมงจากนั้นเอาออกใส่ในโถอบแห้ง (Desiccator) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปชั่งน้ำหนัก

6.7น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นจากน้ำหนักของครูซิเบิล คือ ปริมาณ ADF

7. การวิเคราะห์หา Neutral Detergent Fiber (NDF)

7.1นำครูซิเบิล (Fritted glass crucible) ที่ล้างสะอาดแล้วไปอบในตู้อบแห้ง (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเอาออกใส่ในโถอบแห้ง (Desiccator) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปชั่งน้ำหนัก

7.2 นำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ทำให้แห้งและบดละเอียดขนาดประมาณ 20 -30 mesh หรือ 1 มิลลิเมตร จำนวน 0.5 ถึง 1.0 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ทรงสูงขนาด 600 มิลลิลิตร เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์เยื่อใย

7.3 เติมสารละลาย Neutral Detergent Fiber (NDF) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร Sodium sulphite anhydrous 0.5 กรัม และ Decahydronaphthalene 2 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำไปต้มให้เดือด แล้วปรับอุณหภูมิให้ลดลงเล็กน้อย จากนั้นจึง Reflux ต่อไปเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเริ่มนับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด

7.4 ถ่ายสารละลายและตัวอย่างที่ต้องการทดสอบทั้งหมดที่อยู่ในบีกเกอร์ ลงในครูซิเบิลที่วางอยู่บนชุดกรอง แล้วทำการล้างตัวอย่างที่ติดอยู่ในครูซิเบิล ด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 90 ถึง 100 องศาเซลเซียส ประมาณ 1200 มิลลิลิตร หรือจนกว่าจะไล่สารละลาย Neutral Detergent Fiber (NDF) ออกจนหมด

7.5 ล้างตัวอย่างที่ต้องการทดสอบที่ติดอยู่ในครูซิเบิลอีกครั้งด้วย Acetone 2 ถึง 3 ครั้ง หรือจนกระทั่งสารละลายที่ไหลออกจากครูซิเบิลไม่มีสี

7.6 นำครูซิเบิลไปอบในตู้อบแห้ง (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมงจากนั้นเอาออกใส่ในโถอบแห้ง (Desiccator) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปชั่งน้ำหนัก

7.7 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นจากน้ำหนักของครูซิเบิล คือ ปริมาณ NDF

8. **การวิเคราะห์หา** Permanganate lignin (PML)

8.1 นำครูซิเบิลที่มีตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ซึ่งวิเคราะห์หา ADF แล้ว มาวางในถาดโลหะสแตนเลส

8.2 เติมสารละลาย Combined permanganate ประมาณ 25 มิลลิลิตร หรือให้ท่วมตัวอย่างที่อยู่ในครูซิเบิล ใช้แท่งแก้วคนตัวอย่างให้กระจายไม่จับตัวเป็นก้อน เพื่อให้สารละลายซึมเข้าได้ทั่ว

8.3 ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 90 ถึง 100 นาที ระหว่างนี้ คอยเติม สารละลายเรื่อยๆ เพื่อไม่ให้สารละลายไหลออกนอกครูซิเบิลจนหมด และให้น้ำยาเป็นสีม่วงตลอดเวลา

8.4 นำครูซิเบิลไปวางบนขวดกรอง ดูดสารละลาย Combined permanganate ออกให้แห้ง แล้วเติมสารละลาย Demineralizing (ภาคผนวก ข) ลงไปให้ท่วมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบในครูซิเบิล ระวังอย่าให้เป็นฟอง ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ดูดสารละลายออกให้แห้ง ถ้าสารละลายที่อยู่ในครูซิเบิลยังเป็นสีน้ำตาลเข้ม ให้ทำซ้ำอีก จนกระทั่งล้างสารละลาย Combined permanganate ออกจากครูซิเบิลจนหมด

8.5 ล้างตัวอย่างในครูซิเบิลด้วยสารละลาย 80% Ethanol ประมาณ 2 ครั้ง

8.6 ล้างตัวอย่างในครูซิเบิลด้วย Acetone 2 ครั้ง และดูดสารละลายออกให้แห้ง

8.7 นำครูซิเบิลไปอบในตู้อบแห้ง (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมงจากนั้นเอาออกใส่ในโถอบแห้ง (Desiccator) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปชั่งน้ำหนัก

8.8 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นจากน้ำหนักของครูซิเบิล คือ ปริมาณ PML

9. **การหาปริมาณเถ้า**

นำตะกอนจากข้อ 8 มาเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง จากนั้นเอาออกใส่ในโถอบแห้ง (Desiccator) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปชั่งน้ำหนัก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10. การคำนวณหาค่าปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า

ปริมาณ NDF (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ

((น้ำหนักตัวอย่างที่เหลือจากขั้นตอนวิเคราะห์ NDF – น้ำหนักเถ้า) / น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น) × 100

ปริมาณ ADF (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ

((น้ำหนักตัวอย่างที่เหลือจากขั้นตอนวิเคราะห์ ADF – น้ำหนักเถ้า) / น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น) × 100

ปริมาณเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ

((น้ำหนักตัวอย่างที่เหลือจากขั้นตอนวิเคราะห์ PML – น้ำหนักเถ้า) / น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น) × 100

ปริมาณเฮมิเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ

ปริมาณ NDF (เปอร์เซ็นต์) – ปริมาณ ADF (เปอร์เซ็นต์)

ปริมาณลิกนิน (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ

(((น้ำหนักตัวอย่างที่เหลือจากขั้นตอนวิเคราะห์ ADF – น้ำหนักตัวอย่างที่เหลือจากขั้นตอน วิเคราะห์ PML) – น้ำหนักเถ้า) / น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น) × 100

11. การวัดปริมาณเซลลูเลสในกลุ่มเอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) โดยการวิเคราะห์หา FPA (Ghose, 1987)

11.1 นำเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

11.2 เติมสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกระดาษกรอง Whatman No. 1 ขนาด 1.056.0 เซนติเมตร (50 มิลลิกรัม) เขย่าให้เข้ากัน

11.3 นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

11.4 เติมสารละลาย DNS reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

11.5 เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4.8 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส จากกราฟน้ำตาลมาตรฐานเพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

12. การวัดปริมาณเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) โดยการวิเคราะห์หา CMCase (Ghose, 1987)

12.1 นำเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

12.2 เติม CMC ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อปริมาตร ที่ละลายในสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้ เข้ากัน

12.3 นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

12.4 เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

12.5 เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4.8 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม(blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

13. การวัดปริมาณเซลลูเลสในกลุ่มเบตากลูโคซิเดส (β-glucosidase) โดยการวิเคราะห์หา β-glucosidase ตามวิธีการของ (Sternberg *et al.*,1976)

13.1 นำเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

13.2 เติมสารละลาย salicin ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.025 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

13.3 นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียล นาน 30 นาที

13.4 เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

13.5 เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้ สารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.025 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4.5 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม(blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

14 การวัดแอคติวิตีของไซแลนเนส (Ghose and Bisaria,1987)

14.1 นำไซแลนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อปริมาตร ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

14.2 เติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร

14.3 เติมเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

14.4 นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

14.5 เติมสารละลาย Alkaline copper reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปให้ความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

14.6 เติมสารละลาย Arsenomolybdate reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

14.7 เติมน้ำกลั่นหลอดละ 5.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม (blank)จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลไซโลสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

15 วัดปริมาณโปรตีน (Gornall *et al.*, 1949)

นำ crude enzyme ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Biuret ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA (ภาคผนวก ค) โดยหลอดควบคุม (blank) ใช้น้ำกลั่น

16. การเตรียมถุงไดอะไลซีส

16.1 นำถุงไดอะไลซีสของบริษัท Spectrum Medical Industries, Inc. รุ่น Spectra 1 Por molecularporous membrane tubing ต้มในสารละลายโซเดียมซัลไฟด์ (Na_2SO_3) 0.3 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 80°เซลเซียส เป็นระยะเวลา1 นาที

16.2 ล้างด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

16.3 นำไปแช่ในกรดซัลฟูริค ที่มีความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นล้างออกด้วยน้ำร้อนนาน 5 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

16.4 นำถุงไดอะไลซีสที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมไว้เรียบร้อยนี้ไปบรรจุเอนไซม์ที่ต้องการทำไดอะไลซีสเพื่อแยกสารละลายเกลือออกจากเอนไซม์

17. การเตรียมสไลด์เพื่อศึกษาโครงสร้างของเชื้อรา

17.1 นำสไลด์ กระจกปิดสไลด์ และแท่นวางสไลด์ ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ปิดฝาและนำไปนึ่ง ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

17.2 เตรียมอาหาร PDA เทใส่จานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วอีกชุดหนึ่ง ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็ง จากนั้นใช้มีดผ่าตัด ตัดชิ้นวุ้นเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดประมาณ 0.5 X 0.5 เซนติเมตร

17.3 นำชิ้นอาหารที่ตัดได้มาวางไว้บนสไลด์ในจานเพาะเชื้อที่เตรียมจากข้อ 7.1

17.4 ใช้เข็มเขี่ยลนไฟ ตั้งทิ้งให้เย็น จากนั้นนำไปเขี่ยสปอร์ของเชื้อราที่ต้องการศึกษามาแตะที่มุมทั้งสี่ด้านของชิ้นอาหาร

17.5 ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยต้องระวังไม่ให้กระจกปิดสไลด์เอียงมาแตะกับสไลด์ที่อยู่ด้านล่าง

17.6 เทน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไปเล็กน้อย แต่ไม่ให้ท่วมสไลด์ เพื่อให้เกิดความชื้น

17.7 นำไปบ่มเลี้ยงเพื่อให้เชื้อราเจริญ สังเกตเชื้อราจะค่อยๆเจริญแผ่เส้นใยไปบนสไลด์และกระจกปิดสไลด์

17.8 นำสไลด์ที่มีเส้นใยของเชื้อราเจริญอยู่มาเขี่ยชิ้นอาหารออก แต่ต้องระวังไม่ให้เส้นใยของเชื้อราติดมาด้วย ดังนั้นจะได้ส่วนที่มีเส้นใยเชื้อราติดอยู่ 2 ส่วนคือ ที่สไลด์และกระจกปิดสไลด์

17.9 หยดแอลกอฮอล์สไลด์ 95 เปอร์เซ็นต์ลงบนสไลด์หรือกระจกปิดสไลด์ที่มีเส้นใยเชื้อราอยู่เพื่อให้เส้นใยของเชื้อราแผ่กระจาย ทิ้งให้สักครู่เพื่อให้แอลกอฮอล์ระเหย

17.10 หยดสี Lactophenol-cotton blue หรือ Lactophenol-anelene blue ลงไปเพื่อย้อมเส้นใยเชื้อรา

17.11 นำกระจกปิดสไลด์ที่สะอาดแผ่นใหม่ปิดทับลงไป ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ใช้กระดาษซับสีส่วนเกินออกให้หมด และปิดทับขอบกระจกปิดสไลด์ทั้ง 4 ด้านด้วยน้ำยาทาเล็บ

17.12 นำสไลด์ตัวอย่างเชื้อราที่ได้ไปดูรายละเอียดด้วยกล้องจุลทรรศน์

18. การเตรียมสารละลายตรวจสอบน้ำตาล (Detection reagent) (Chaplin and Kennedy, 1994)

ชั่ง Diphenylamine 4 กรัมในอะซีโตน ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร แบ่งมา 96 มิลลิลิตรจากนั้นใช้ปิเปตดูด Aniline มา 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติม ortho-phosphoric acid ปริมาตร 20มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานและการคำนวณค่าแอคติวิตี

1. การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

1.1 เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ละลายในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 5.0 โดยมีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0.00 0.20 0.40 0.60 0.80 1.00 1.20 1.40 และ 1.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2 ใส่สารละลายน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมได้จากข้อ 1.1 ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

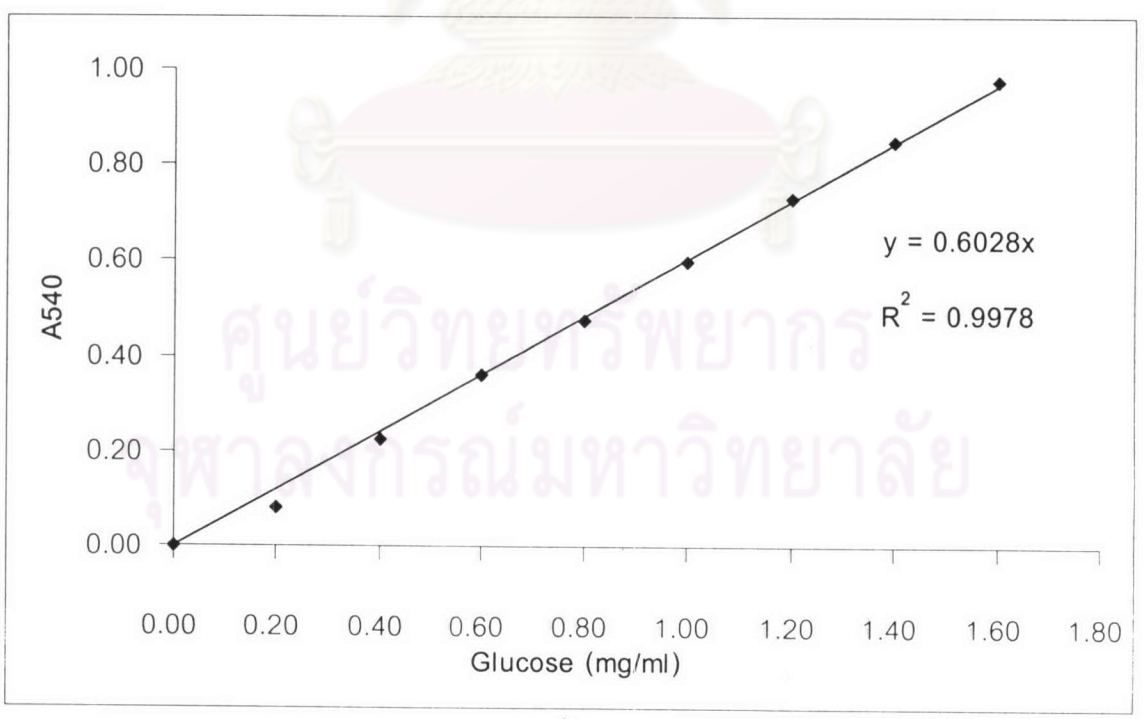
1.3 ใส่สารละลาย DNS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด

1.4 นำไปตั้งในอ่างน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

1.5 เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร

1.6 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยหลอดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายน้ำตาลกลูโคส

1.7 นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าดูดกลืนแสงและปริมาณน้ำตาลกลูโคส



กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

2.1 เตรียมสารละลายน้ำตาลไซโลสที่ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 7.0 โดยมีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0.00 0.025 0.050 0.075 0.100 0.125 0.150 0.175 และ 2.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2 ใส่สารละลายน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 0.25 มิลลิลิตร ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

2.3 ใส่สารละลาย Alkali copper reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด

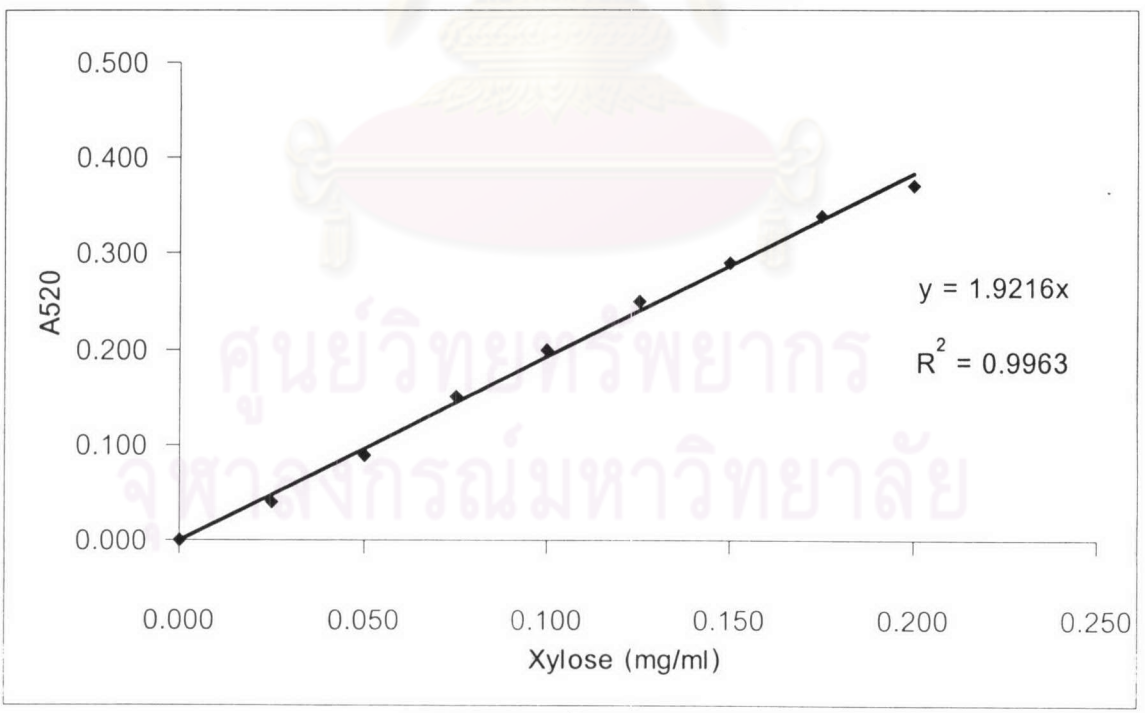
2.4 นำไปตั้งในอ่างน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

2.5 ใส่สารละลาย Arsenomolybdate reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด

2.6 เติมน้ำกลั่นหลอดละ 10 มิลลิลิตร

2.7 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยหลอดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายน้ำตาลไซโลส

1.7 นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าดูดกลืนแสงและปริมาณน้ำตาลไซโลส



กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การทำกราฟมาตรฐานโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA)

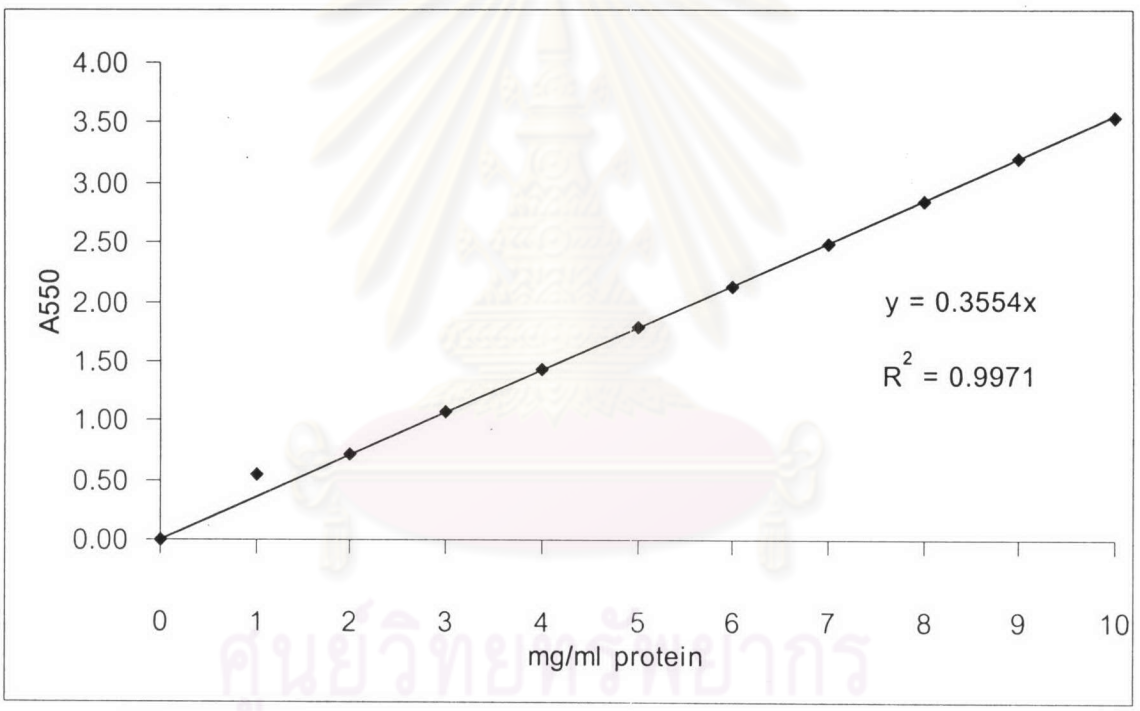
3.1 **เตรียมสารละลาย** Bovine Serum Albumin (BSA) **ให้มีความเข้มข้น** 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 **และ** 10 **มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

3.2 ใส่สารละลาย BSA ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

3.3 เติมสารละลาย Biuret (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอดจากนั้นเขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

3.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 550 นาโนเมตร โดยหลอดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายโปรตีน BSA

3.5 นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีน



กราฟมาตรฐานโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การคำนวณค่า Unit of enzyme ตามวิธีของ The International Union of Biochemistry

4.1 การคำนวณแอคติวิตีของเอกโซกลูคาเนส

1 หน่วยของเอนไซม์ (ยูนิต) เท่ากับ ปริมาณของกลูโคส 1 ไมโครโมล ที่เกิดขึ้น ภายใน 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ

เท่ากับ กลูโคส 0.180 มิลลิกรัม ที่เกิดขึ้นภายใน 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ

กลูโคส 0.180 มิลลิกรัม	เท่ากับ	1	ไมโครโมล
กลูโคส A มิลลิกรัม	เท่ากับ	(1 X A) / 0.180	ไมโครโมล
	เท่ากับ	A X 5.556	ไมโครโมล

จากการทดลองน้ำตาลกลูโคส A X 5.556 ไมโครโมล เกิดขึ้นภายใน 60 นาที

60 นาที มีน้ำตาลกลูโคส	เท่ากับ	A X 5.556	ไมโครโมล
1 นาที มีน้ำตาลกลูโคส	เท่ากับ	(1 X (A X 5.556)) / 60	ไมโครโมลต่อนาที
	เท่ากับ	A X 0.093	ไมโครโมลต่อนาที

จากการทดลองน้ำตาลกลูโคส A X 0.093 ไมโครโมลต่อนาที เกิดจากการใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร

ใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร มีน้ำตาลกลูโคส	เท่ากับ	A X 0.093	ไมโครโมลต่อนาที
ใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร มีน้ำตาลกลูโคส	เท่ากับ	(1 X (A X 0.093)) / 0.5	ไมโครโมลต่อนาที ต่อมิลลิลิตร

เท่ากับ A X 0.186 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร

เท่ากับ A X 0.186 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การคำนวณแอคติวิตีของเอนโดกลูคาเนสและเบตากลูโคซิเดส

1 หน่วยของเอนไซม์ (ยูนิต) เท่ากับ ปริมาณของกลูโคส 1 ไมโครโมล ที่เกิดขึ้นภายใน 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ
เท่ากับ กลูโคส 0.180 มิลลิกรัม ที่เกิดขึ้นภายใน 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ

กลูโคส 0.180 มิลลิกรัม	เท่ากับ	1	ไมโครโมล
กลูโคส A มิลลิกรัม	เท่ากับ	(1 X A) / 0.180	ไมโครโมล
	เท่ากับ	A X 5.556	ไมโครโมล

จากการทดลองน้ำตาลกลูโคส A X 5.556	ไมโครโมล เกิดขึ้นภายใน 30		นาที
10 นาที มีน้ำตาลกลูโคส	เท่ากับ	A X 5.556	ไมโครโมล
1 นาที มีน้ำตาลกลูโคส	เท่ากับ	(1 X (A X 5.556)) / 30	ไมโครโมลต่อนาที
	เท่ากับ	A X 0.185	ไมโครโมลต่อนาที

จากการทดลองน้ำตาลกลูโคส A X 0.185	ไมโครโมลต่อนาที เกิดจากการใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร		
ใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร มีน้ำตาลกลูโคส	เท่ากับ	A X 0.185	ไมโครโมลต่อนาที
ใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร มีน้ำตาลกลูโคส	เท่ากับ	(1 X (A X 0.185)) / 0.5	ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร

เท่ากับ A X 0.370 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร
เท่ากับ A X 0.370 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การคำนวณแอคติวิตีของไซแลนเนส

1 หน่วยของเอนไซม์ (ยูนิต) เท่ากับ ปริมาณของไซโลส 1 ไมโครโมล ที่เกิดขึ้นภายใน 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ
เท่ากับ ไซโลส 0.150 มิลลิกรัม ที่เกิดขึ้นภายใน 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ

ไซโลส 0.150 มิลลิกรัม	เท่ากับ	1	ไมโครโมล
ไซโลส A มิลลิกรัม	เท่ากับ	(1 X A) / 0.150	ไมโครโมล
	เท่ากับ	A X 6.667	ไมโครโมล

จากการทดลองน้ำตาลไซโลส A X 6.667 ไมโครโมล เกิดขึ้นภายใน 10 นาที

10 นาที มีน้ำตาลไซโลส	เท่ากับ	A X 6.667	ไมโครโมล
1 นาที มีน้ำตาลไซโลส	เท่ากับ	(1 X (A X 6.667))/10	ไมโครโมลต่อนาที
	เท่ากับ	A X 0.667	ไมโครโมลต่อนาที

จากการทดลองน้ำตาลไซโลส A X 0.667 ไมโครโมลต่อนาที เกิดจากการใช้เอนไซม์ 0.25 มิลลิลิตร

ใช้เอนไซม์ 0.25 มิลลิลิตร มีน้ำตาลไซโลส	เท่ากับ	A X 0.667	ไมโครโมลต่อนาที
ใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร มีน้ำตาลไซโลส	เท่ากับ	(1 X (A X 0.667)) / 0.25	ไมโครโมลต่อนาที ต่อมิลลิลิตร

เท่ากับ A X 2.668 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร
เท่ากับ A X 2.668 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายขรรค์ชัย ดั้นเมฆ เกิดเมื่อวันที่ 5 มีนาคม พ.ศ. 2522 ที่จังหวัดอุตรดิตถ์ สำเร็จการศึกษามัธยมต้นที่โรงเรียนพิชัย ปีการศึกษา 2535 มัธยมปลายที่โรงเรียนอุตรดิตถ์ดรุณีปีการศึกษา 2538 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยนเรศวร ปีการศึกษา 2542 และได้รับทุนพัฒนาอาจารย์วิทยาเขตสารสนเทศ มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในภาคต้น ปีการศึกษา 2543 สำเร็จการศึกษา ปีการศึกษา 2546

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย