ภาคผนวก 1
การหาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solid) โดยใช้รีแฟรคโตมิเตอร์ (Refractometer)

หลักการ

การวัดปริมาณน้ำตาลโดยรีแฟรคโตมิเตอร์ (refractometer) เป็นการวัดโดยอาศัยหลักการของการหักเหแสงของสารตัวอย่างเปรียบเทียบกับน้ำกลั่น ในสารตัวอย่างมีโมเลกุลหลายชนิดที่มีคุณสมบัติในการหักเหแสง การใช้เครื่องมือวัดการหักเหแสงมีสเกลเป็นองศาบริกซ์ โดยมีการเทียบกับสารละลายซูโครสค่าที่ได้เป็นสเกลดัชนีการหักเหแสง (refractive index scale) ซึ่งสามารถอ่านค่าองศาบริกซ์โดยตรงของสารตัวอย่าง การวัดปริมาณน้ำตาลในน้ำผลไม้เป็นการวัดของแข็งที่สามารถละลายได้ (soluble solids) ในน้ำผลไม้นั้นๆ ซึ่งของแข็งที่สามารถละลายได้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลประมาณร้อยละ 90 – 95 นอกจากนั้นจะเป็นกรดและสารประกอบอื่นๆ ที่สามารถละลายได้ ค่าที่วัดออกมาเทียบเท่ากับน้ำหนักของน้ำตาล (กรัม) ในน้ำผลไม้ 100 กรัม หรือมีค่าเท่ากับร้อยละ การวัดปริมาณน้ำตาลโดยวิธีนี้จะทำให้ทราบว่าควรปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นกี่องศาบริกซ์เพื่อให้ได้ไวน์ที่มีปริมาณแอลกอฮอล์ตามที่ต้องการ อย่างไรก็ตามของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดโดยเฉพาะเอทานอลในน้ำผลไม้มีผลต่อค่าดัชนีการหักเหแสง ดังนั้นสารตัวอย่างที่ได้จากการหมักจะให้องศาบริกซ์ผิดพลาดได้สูง (Zoecklein และคณะ, 1995)

วิธีการ

1) ใช้ผ้าสะอาดนุ่มชุบน้ำ ทำความสะอาดปริซึมของเครื่องรีแฟรคโตมิเตอร์และเช็ดให้แห้ง

2) หยดน้ำกลั่นลงบนปริซึม 1 - 2 หยด ปิดฝาครอบเพื่อให้น้ำกลั่นกระจายทั่วพื้นผิวของปริซึม ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้นมองผ่านเลนส์ตา และปรับตัวเลขให้เป็น “0” เมื่อปรับแล้วให้ทำความสะอาดปริซึมอีกครั้ง

3) ใช้หลอดดูดตัวอย่างที่ต้องการวัดแล้วหยดลงบนปริซึม 1 - 2 หยด

4) ปิดฝาครอบเพื่อให้ตัวอย่างกระจายทั่วพื้นผิวของปริซึม ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเพราะจะมีผลทำให้ค่าที่อ่านได้ผิดไป

5) มองเลนส์ตาและอ่านค่าที่ระดับเส้นรอยต่อที่ตัดกับพื้นสีฟ้า ค่าที่อ่านได้มีหน่วยเป็นองศาบริกซ์ ซึ่งเทียบเท่ากับเปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (จำนวนกรัมของสารที่ละลายได้ต่อ 100 กรัมของสารตัวอย่าง)

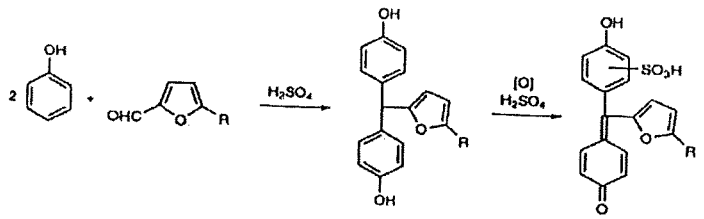
6) ใช้กระดาษเช็ดเลนส์เช็ดตัวอย่างที่ติดอยู่กับปริซึมออก แล้วทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นและเช็ดให้แห้ง

ภาคผนวก 2
การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดทั้งหมดโดยวิธี Phenol sulfuric

การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีนี้ สามารถตรวจวัดความเข้มข้นน้ำตาลในช่วง 1 – 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และเป็นวิธีการที่รวดเร็วที่จะวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่จำเพาะเจาะจง เพราะไม่ว่าน้ำตาลนั้นจะอยู่ในรูปน้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลนอนรีดิวส์ หรือน้ำตาลในธรรมชาติที่พบอยู่ในรูปโมโน (mono) ได (di) ไตร (tri) โอลิโก (oligo) และโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ก็สามารถวิเคราะห์หาน้ำตาลได้ด้วยวิธีนี้ (Scherz and Bonn, 1998)

1. หลักการ

น้ำตาลโมโน (mono) ได (di) ไตร (tri) โอลิโก (oligo) และโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ทำปฏิกิริยากับฟีนอลและกรดซัลฟูริคเข้มข้น ทำให้เกิดอุณหภูมิสูงและการเปลี่ยนแปลงรูปลักษณ์เป็นสารที่มีสีและสามารถดูดซับแสงสูงสุดที่ช่วงความยาวคลื่น 480 – 490 นาโนเมตร สำหรับกลไกการเกิดปฏิกิริยานั้นน้ำตาลโอลิโกและโพลีแซคคาไรด์ ถูกตัดพันธะอีเธอร์ระหว่างโมเลกุลให้ออกจากกันด้วยกรด พร้อมกับเกิดปฏิกิริยาการแทนที่ด้วยอนุพันธ์ของเฟอร์ฟูรอล (furfural derivatives) รวมตัวกับฟีนอล กลายเป็นสีไตรเอริลมีเทน เป็นสารประกอบสีส้ม (triarylmethane dyes)



รูปที่ ผ.1 ปฏิกิริยาระหว่างฟีนอลและคาร์โบไฮเดรต (ฟรุคโตส) ในกรดซัลฟูริคเข้มข้นได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบที่มีสีส้มของสาร triarylmethane dyes (Scherz และ Bonn, 1998)

2. สารเคมี

- สารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เตรียมโดยละลายผลึกของฟีนอล 25.0 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร
- กรดซัลฟูริคเข้มข้น

3. วิธีการวิเคราะห์

1) ใช้ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ขณะเดียวกันทำกับสารไร้ตัวอย่าง (blank) ด้วย โดยการใช้น้ำกลั่นปริมาตรเท่ากันแทนตัวอย่าง

2) เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร ในตัวอย่างผสมให้เข้ากัน

3) เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงในสารผสมข้อ 2) ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเขย่าแรง ๆ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) (ระวังกรดผสมน้ำจะเกิดความร้อนและเดือด) ตั้งทิ้งไว้อีกประมาณ 20 นาที

4) นำชุดทดลองไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เพื่อเปรียบเทียบกับกราฟเทียบความเข้มข้นมาตรฐาน (standard curve) ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน และค่าการดูกลืนแสง

4. ปัญหาที่เกิดขึ้นและแนวทางแก้ไข

1) ค่าที่ได้ไม่แน่นอน แก้ไขโดยพยายามควบคุมการทดลองให้เหมือนๆ กันทุกครั้ง และเพื่อให้ได้ค่าที่แม่นยำควรทำการทดลองซ้ำและมีการทำชุดสารละลายมาตรฐานควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง

2) กรดเข้มข้นละลายน้ำแล้วจะเกิดปฏิกิริยาคายความร้อนอุณหภูมิจะสูงขึ้น และมีฤทธิ์กัดกร่อนควรทำการทดลองด้วยความระมัดระวัง

5. การคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสามารถคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)} = \text{ค่าการดูดกลืนแสง } (OD_{490}) \times \frac{1}{\text{ความชัน}} \times \frac{1}{\text{การเจือจาง}}$$

โดย ความชัน = ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน

และการเจือจาง = ค่าเจือจางตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

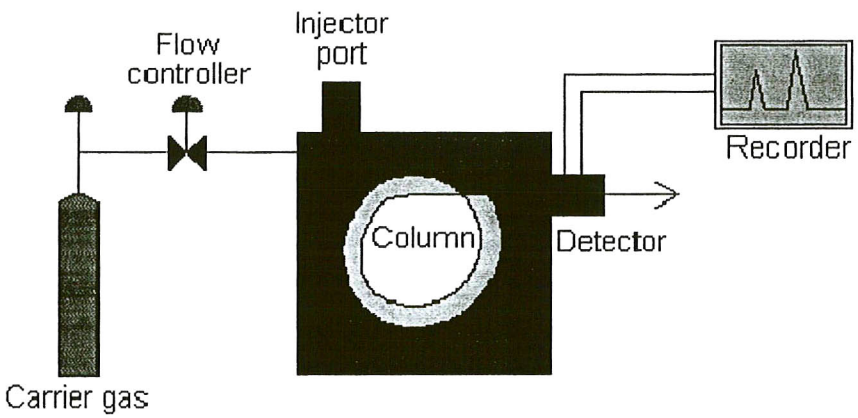
ภาคผนวก 3
การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography method)

1. หลักการวิเคราะห์

ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์หรือเอทานอลที่ผลิตโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์นั้นมักจะวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี แก๊สโครมาโทกราฟีประกอบด้วยคอลัมน์ ที่สามารถดูดซับเอทานอลหรือแอลกอฮอล์อื่น ๆ ได้ ภายใต้อุณหภูมิและอัตราการไหลของแก๊สนำพา (ไนโตรเจน) ที่เหมาะสม กล่องควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ตั้งค่าไว้ที่ 150 องศาเซลเซียส และอัตราการไหลของแก๊สนำพาตั้งไว้ที่ 200 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

สารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร ถูกฉีดเข้าไปในคอลัมน์ด้วยไมโครไซริง (mycrosyring) ตัวอย่างจะระเหยกลายเป็นไอ และถูกพาเข้าสู่คอลัมน์ ซึ่งในคอลัมน์นี้แอลกอฮอล์จะถูกแยกออกจากองค์ประกอบอื่นๆ เมื่อไอระเหยออกจากคอลัมน์ก็จะเข้าสู่เครื่องตรวจวัด จากนั้นเครื่องตรวจวัดจะส่งสัญญาณไปที่เครื่องบันทึกข้อมูล ซึ่งแสดงข้อมูลที่ได้ออกมาเป็นพีค (peak) โดยพื้นที่ใต้พีคนี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอทานอลในสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไป

เนื่องจากเป็นการยากที่จะฉีดสารตัวอย่างปริมาณน้อยๆ ได้ถูกต้องและแม่นยำ และพื้นที่ใต้พีคจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาตรที่ฉีดเข้าไปด้วย ดังนั้นจึงมีการผสมสารมาตรฐานภายใน (internal standard) ลงไปในตัวอย่างด้วย เมื่อสารมาตรฐานภายในที่เติมลงไปมีความเข้มข้นคงที่และเท่ากันทุกตัวอย่าง ดังนั้นการหาความเข้มข้นของเอทานอลจะใช้อัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของเอทานอล และสารละลายมาตรฐานภายใน ด้วยวิธีการนี้การวิเคราะห์จึงสามารถลดความผิดพลาดของสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไปได้



รูปที่ ผ.2 แผนภาพเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

(ที่มา: http://weather.nmsu.edu/Teaching_Material/SOIL698/)

2. วิธีการวิเคราะห์ (Laopaiboon และคณะ, 2009)

1) นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ไว้วิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

2) นำส่วนใสของตัวอย่างที่ได้มา 1 ส่วน เติม n-propanol ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) ลงไปด้วยปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของตัวอย่าง

3) ฉีดสารตัวอย่างที่เตรียมได้ 1 ไมโครลิตร เข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

4) หลังจากฉีดตัวอย่างเข้าไปแล้วประมาณ 15 นาที เครื่องอินทิเกรเตอร์ (integrator) จะแสดงพีคของเอทานอล ออกมาก่อนตามด้วยพีคของ n-propanol โดยเวลาชะ (retention time) ของเอทานอลและ n-propanol มีค่าประมาณ 5.5 และ 10.7 นาที ตามลำดับ เครื่องอินทิเกรเตอร์จะคำนวณพื้นที่ใต้พีคออกมาให้โดยอัตโนมัติ จากนั้นคำนวณหาอัตราส่วนพื้นที่ใต้ยอดเอทานอลต่อ n-propanol แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร)

5) ในแต่ละตัวอย่างทำซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นเอทานอล

6) ก่อนจะฉีดตัวอย่างต่อไปควรรอประมาณ 15 นาที หลังจากที่พีคที่สองออกมาแล้ว เพื่อเป็นการไล่สารที่อาจตกค้างอยู่ในคอลัมน์ออกให้หมด

3. การคำนวณปริมาณแอลกอฮอล์จากเปอร์เซนต์โดยปริมาตร (% v/v) เป็นกรัมต่อลิตร

สมมุติปริมาณแอลกอฮอล์ที่วัดได้จากวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) ได้ร้อยละ X (โดยปริมาตร)

นั่นคือ สารตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร มีปริมาณแอลกอฮอล์ = X มิลลิลิตร

ถ้า สารตัวอย่าง 1,000 มิลลิลิตร มีปริมาณแอลกอฮอล์ = $\frac{X \times 1{,}000}{100}$

= $X \times 10$ มิลลิลิตร

จากความหนาแน่นของเอทานอล = 0.79 กรัมต่อมิลลิลิตร

เพราะฉะนั้น ปริมาณแอลกอฮอล์ = $X \times 10$ มิลลิลิตร $\times 0.79$ กรัมต่อมิลลิลิตร

= $X \times 10 \times 0.79$ กรัมต่อลิตร

ภาคผนวก 4
การวัดการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี Microscopic count

1. หลักการ

Heamacytometer เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับนับเม็ดเลือดแดงแต่ได้นับมาประยุกต์ในการนับจำนวนจุลินทรีย์และสปอร์ของรา เครื่องมือนี้เป็นสไลด์มีช่องแบ่งไว้แน่นอน และมีขอบยกสูงจากบริเวณขีดเมื่อปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ขอบนี้จะรองรับกระจกปิดสไลด์ไว้ ทำให้เกิดระยะห่างจากกระจกปิดสไลด์ ในบริเวณที่ขีดคิดเป็นความลึกได้ 0.1 หรือ 0.2 มิลลิลิตร แล้วแต่บริษัทผู้ผลิต ขีดแบ่งที่กำหนดไว้ประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 25 ช่อง แต่ละช่องมีขนาด 0.2 x 0.2 ตารางมิลลิเมตร ในแต่ละช่องใหญ่นี้ มีขีดแบ่งเป็นช่องเล็กอีก 16 ช่อง แต่ละช่องมีพื้นที่ 0.05 x 0.05 ตารางมิลลิเมตร (รูปที่ ผ.4) ดังนั้นของเหลวที่บรรจุอยู่ในแต่ละช่องเล็กจะมีปริมาตร 0.00025 (0.05x0.05x0.1) ลูกบาศก์มิลลิลิตร เครื่องมือนี้จะมีกระจกปิดสไลด์ซึ่งมีขนาดและความหนาเฉพาะ ไม่ควรใช้กระจกปิดสไลด์อื่นแทน เนื่องจากน้ำหนักของกระจกจะมีผลทำให้ปริมาตรภายในช่องระหว่างสไลด์กับกระจกผิดไป และเมื่อใช้กระจกที่หนาจะเป็นอุปสรรคต่อการโฟกัสกล้อง

ตัวอย่างจุลินทรีย์ควรเจือจางให้อยู่ในระดับที่สามารถตรวจนับจุลินทรีย์ในแต่ละช่องใหญ่ (16 ช่องเล็กภายใน) ได้ โดยมีค่าระหว่าง 10 – 50 เซลล์ การนับในช่องใหญ่นี้ให้นับเป็นจำนวน 5 ช่อง (บริเวณหัวมุม 4 ช่อง และตรงกลาง 1 ช่อง) แล้วนำค่ามาเฉลี่ย (Zoecklein และคณะ, 1995)

2. การตรวจนับ

1) ล้าง Heamacytometer ให้สะอาดและเช็ดให้แห้ง

2) ปิดทับบริเวณสีเหลี่ยมซึ่งมีช่องแบ่งด้วยกระจกปิดสไลด์

3) ใช้ปิเปตและลูกยางดูดตัวอย่าง แตะปลายปิเปตด้านแหลมที่มีช่องว่างระหว่างสไลด์และกระจกปิดสไลด์ ค่อยปล่อยตัวอย่างให้ซึมเข้าไปในบริเวณช่อง ซึ่งกำหนดปริมาตรดังกล่าวไว้ข้างต้น

4) นับจำนวนจุลินทรีย์โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 40 เท่า

5) การนับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็ก ควรตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งสิ้นไม่น้อยกว่า 5 ช่องใหญ่ (16 ช่องเล็ก) โดยจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องควรมีค่าอยู่ระหว่าง 10 – 50 เซลล์

3. การคำนวณปริมาณจุลินทรีย์

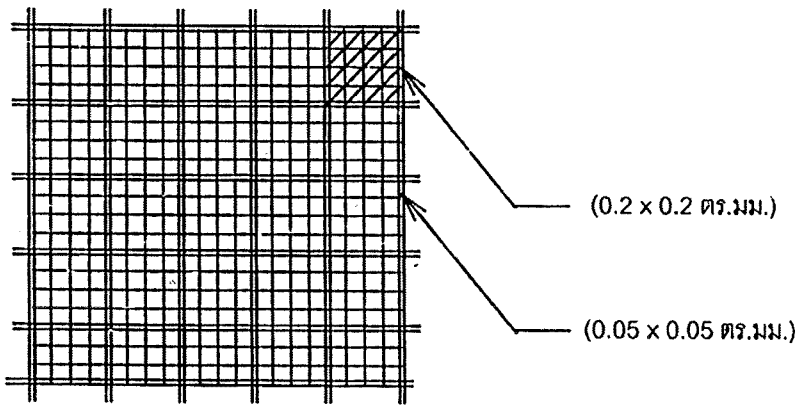
รวมจำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้จากแต่ละช่องใหญ่ จะได้ X เซลล์ต่อช่อง (ควรได้ 10 – 50 เซลล์)

คำนวณจุลินทรีย์ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ได้ดังนี้

การนับจาก 5 ช่องใหญ่ (มี16 ช่องเล็กภายใน)

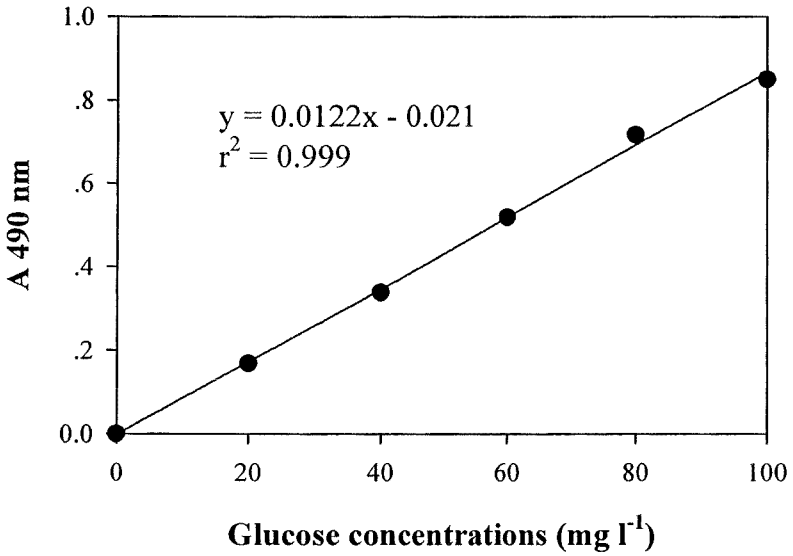
ตัวอย่าง ที่มีปริมาตร 0.2 มิลลิเมตร (กว้าง) x 0.2 มิลลิเมตร (ยาว) x 0.1 มิลลิเมตร (สูง) x 5 (ช่อง) ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีจุลินทรีย์ = X เซลล์

= X x 5 x (10^4) x dilution factor (ค่าที่เจือจางจุลินทรีย์) เซลล์ต่อมิลลิลิตร

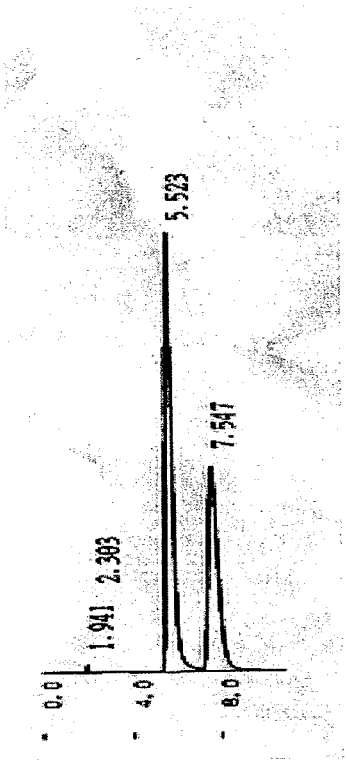


รูป ผ.3 ตัวอย่างช่องสี่เหลี่ยมภายในสไลด์ Heamacytometer (Zoecklein และคณะ, 1995)

ภาคผนวก 5
กราฟมาตรฐานและโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน

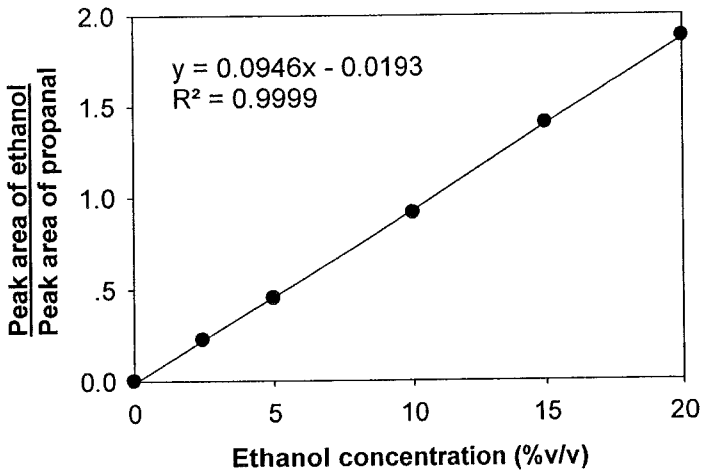


รูปที่ ผ.4 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสสำหรับใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

รูปที่ ผ.5 โครมาโตแกรมของเอทานอลมาตรฐาน (5.523 นาที) และโพรพานอล (7.547 นาที)



รูปที่ ผ.6 กราฟมาตรฐานของเอทานอลโดยใช้แก๊สโครมาโตกราฟี