

ภาคผนวก 1

การหาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solid)
โดยใช้รีแฟรคโตมิเตอร์ (Refractometer)

วิธีการ (Zoecklein และคณะ, 1995)

- 1) ใช้กระดาษทิชชูนุ่มชุบน้ำ ทำความสะอาดปริซึมของเครื่องรีแฟรคโตมิเตอร์และเช็ดให้แห้ง
- 2) หยดน้ำกลั่นลงบนปริซึม 1-2 หยด ปิดฝาครอบเพื่อให้ น้ำกลั่นกระจายทั่วพื้นผิวของปริซึม ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้นมองผ่านเลนส์ตา และปรับตัวเลขให้เป็น “0” เมื่อปรับแล้วให้ทำความสะอาดปริซึมอีกครั้ง
- 3) ใช้หลอดดูดตัวอย่างที่ต้องการวัดแล้วหยดลงบนปริซึม 1-2 หยด
- 4) ปิดฝาครอบเพื่อให้ตัวอย่างกระจายทั่วพื้นผิวของปริซึม ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ เพราะจะมีผลทำให้ค่าที่อ่านได้ผิดไป
- 5) มองเลนส์ตา และอ่านค่าที่ระดับเส้นรอยต่อที่ตัดกับพื้นสีฟ้า ค่าที่อ่านได้มีหน่วยเป็นองศา-บริกซ์ ซึ่งเทียบเท่ากับเปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (จำนวนกรัมของสารที่ละลายได้ ต่อ 100 กรัมของสารตัวอย่าง)
- 6) ใช้กระดาษทิชชูนุ่มที่ชุบน้ำเช็ดตัวอย่างที่ติดอยู่กับปริซึมออก และเช็ดให้แห้ง

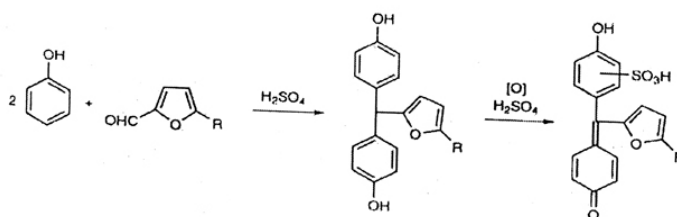
ภาคผนวก 2

การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดทั้งหมดโดยวิธี Phenolic and concentrate sulfuric acid

การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีนี้ สามารถตรวจวัดปริมาณน้ำตาลช่วง 1 – 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และเป็นวิธีการที่รวดเร็วที่จะวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่จำเพาะเจาะจง เพราะไม่ว่าน้ำตาลนั้นจะอยู่ในรูปน้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลนอนรีดิวซ์ หรือน้ำตาลในธรรมชาติที่พบอยู่ในรูป mono-, di-, tri-, oligo- และ polysaccharide ก็สามารถวิเคราะห์หาน้ำตาลได้ด้วยวิธีนี้

1. หลักการทางปฏิกิริยา

น้ำตาล mono-, di-, tri-, oligo- และ polysaccharide ทำปฏิกิริยากับฟีนอล และกรดซัลฟูริกเข้มข้น ที่อุณหภูมิสูง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นสารที่มีสี สามารถดูดซับแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 480 – 490 นาโนเมตร สำหรับกลไกการเกิดปฏิกิริยา เชื่อว่าในกรณีน้ำตาล oligo- และ polysaccharide ถูกตัดพันธะอีเธอร์ระหว่างโมเลกุลให้ออกจากกันด้วยกรด พร้อมกันนั้น ก็เกิดปฏิกิริยาการจัดน้ำออกที่แทนที่ด้วยอนุพันธ์ของเฟอร์ฟูรอล (furfural derivatives) ที่จะเกิดการรวมตัวกับฟีนอล กลายเป็นสีไตรเอริลมีเทน เป็นสารประกอบสีส้ม (triarylmethane dyes) (ดังรูปที่ ผ.1)



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

2. สารเคมี

- สารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เตรียมได้โดยละลายผลึกของฟีนอล 25.0 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร
- กรดซัลฟูริกเข้มข้น

3. วิธีการวิเคราะห์ (Scherz และ Bonn, 1998)

- 1) ใช้ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ขณะเดียวกันก็ทำกับสารไร้ตัวอย่าง (blank) ด้วย โดยการใช้ น้ำกลั่น ปริมาตรเท่ากันแทนตัวอย่าง
- 2) เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร ในตัวอย่างผสมให้เข้ากัน
- 3) เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงในสารผสมข้อ 2) ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเขย่าแรง ๆ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) (ระวังกรดผสมน้ำ จะร้อนเดือด) ตั้งทิ้งไว้ อีกประมาณ 20 นาที
- 4) นำชุดทดลองไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เทียบความเข้มข้นกับ สารละลายมาตรฐาน (standard curve) ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน และค่าการดูดกลืนแสง

4. ปัญหาที่เกิดขึ้นและแนวทางแก้ไข

- 1) ค่าที่ได้ไม่แน่นอน แก้ไขโดยพยายามควบคุมการทดลองให้เหมือนกันทุกครั้ง ซึ่งต้องไปปรับวิธีการตามความเหมาะสม และเพื่อให้ได้ค่าที่แม่นยำควรทำการทดลองซ้ำและควรมีการทำชุดสารละลายมาตรฐานควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง
- 2) กรดเข้มข้นละลายน้ำแล้วคายความร้อน จะมีอุณหภูมิสูง และมีฤทธิ์กัดกร่อนควรทำการทดลองด้วยความระมัดระวัง

5. การคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ปริมาณน้ำตาลสามารถคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

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

โดย ความชัน = ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน

และการเจือจาง = ค่าเจือจางตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

ภาคผนวก 3

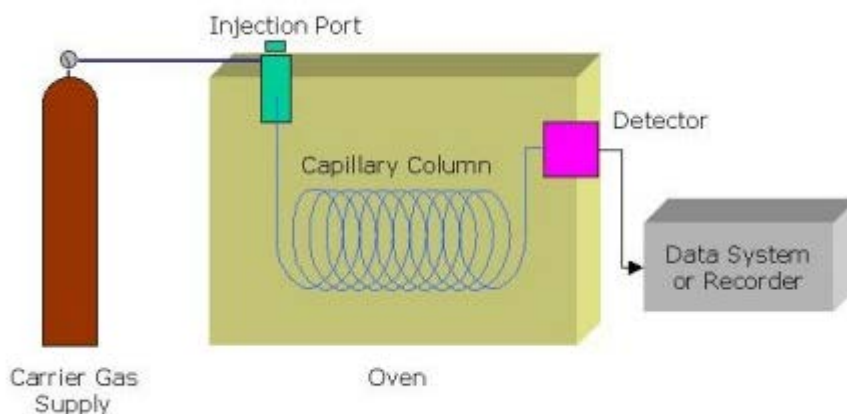
การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography method)

1. หลักการวิเคราะห์

ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์หรือเอทานอลที่ผลิตโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์นั้นมักจะวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (ดังรูปที่ ผ.2) แก๊สโครมาโทกราฟีประกอบด้วยคอลัมน์ที่สามารถดูดซับเอทานอลหรือแอลกอฮอล์อื่น ๆ ได้ ภายใต้อุณหภูมิและอัตราการไหลของแก๊สนำพา (ไนโตรเจน) ที่เหมาะสม กล้องควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ตั้งค่าไว้ที่ 150 องศาเซลเซียส และอัตราการไหลของแก๊สนำพาตั้งไว้ที่ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

สารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร ถูกฉีดเข้าไปในคอลัมน์ด้วยไมโครไซริง (microsyringe) อย่างรวดเร็ว ตัวอย่างจะระเหยกลายเป็นไอทันที และถูกพาเข้าสู่คอลัมน์ ซึ่งในคอลัมน์นี้แอลกอฮอล์จะถูกแยกออกจากองค์ประกอบอื่น ๆ เมื่อไอระเหยออกจากคอลัมน์ก็จะเข้าสู่เครื่องตรวจจับ จากนั้นเครื่องตรวจจับจะส่งสัญญาณไปที่เครื่องบันทึกข้อมูล ซึ่งแสดงข้อมูลที่ได้ออกมาเป็นพีค (peak) โดยพื้นที่ใต้พีคนี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอทานอลในสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไป

เนื่องจากการยากที่จะวัดสารตัวอย่างปริมาณน้อย ๆ ได้ถูกต้องและแม่นยำ และพื้นที่ใต้พีคจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาตรที่ฉีดเข้าไปด้วย ดังนั้น จึงมักมีการผสมสารมาตรฐาน (internal standard) ลงไปในตัวอย่างด้วย เมื่อสารมาตรฐานที่เติมลงไปมีความเข้มข้นคงที่และเท่ากันทุกตัวอย่าง ดังนั้นการหาความเข้มข้นของเอทานอลจะใช้อัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของเอทานอล และสารละลายมาตรฐาน ด้วยวิธีการนี้การวิเคราะห์จึงไม่ขึ้นกับปริมาตรของสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไป



รูปที่ ผ.2 Block diagram of gas chromatography ในการวิเคราะห์หาเอทานอล
(ที่มา : <http://depts.washington.edu/spectral/massspec/GCMSintro/>)

2. วิธีการวิเคราะห์ (ดัดแปลงจาก Laopaiboon และคณะ 2007)

- 1) นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 10,000 rpm เก็บส่วนใส (supernatant) ไว้วิเคราะห์ปริมาณเอทานอล
- 2) นำส่วนใสของตัวอย่างที่ได้มา 200 ไมโครลิตร เติม n-propanol ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน (internal standard) ลงไปด้วยปริมาตรที่แน่นอน 200 ไมโครลิตร

- 3) ฉีดสารตัวอย่างที่เตรียมได้ 1 ไมโครลิตร เข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี
- 4) หลังจากฉีดตัวอย่างเข้าไปแล้วประมาณ 15 นาที เครื่องอินทิเกรเตอร์ (integrator) แสดงพีคของเอทานอล ออกมาก่อนตามด้วยพีคของ n-propanol โดยเวลาชะ (retention time) ของเอทานอลและ n-propanol มีค่าประมาณ 5.523 และ 7.547 นาที (ดังรูปผ.3) ตามลำดับ เครื่องอินทิเกรเตอร์จะคำนวณพื้นที่ใต้พีคออกมาให้โดยอัตโนมัติ จากนั้นคำนวณหาอัตราส่วนพื้นที่ใต้ยอดเอทานอลต่อ n-propanol แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร)
- 5) ในแต่ละตัวอย่างทำซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นเอทานอล

3. การคำนวณปริมาณแอลกอฮอล์จากเปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (% v/v) เป็นกรัมต่อลิตร

สมมุติปริมาณแอลกอฮอล์ที่วัดได้จากวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) ได้ X เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร)

นั่นคือ สารตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร มีปริมาณแอลกอฮอล์ = X มิลลิลิตร

$$\text{ถ้าสารตัวอย่าง 1,000 มิลลิลิตร} \quad \text{มีปริมาณแอลกอฮอล์} = \frac{X \times 1,000}{100}$$

$$= X \times 10 \text{ มิลลิลิตร}$$

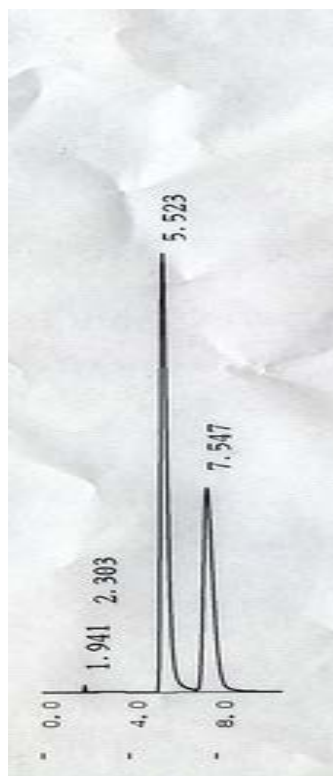
จากความหนาแน่นของเอทานอล

$$= 0.79 \text{ กรัมต่อมิลลิลิตร}$$

เพราะฉะนั้น ปริมาณแอลกอฮอล์

$$= X \times 10 \text{ มิลลิลิตร} \times 0.79 \text{ กรัมต่อมิลลิลิตร}$$

$$= X \times 10 \times 0.79 \text{ กรัมต่อลิตร}$$



รูปที่ ผ.3 โครมาโตแกรมของเอทานอลมาตรฐาน (5.523 นาที) และโพรพานอล (7.547 นาที)

ภาคผนวกที่ 4

การวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอลโดย HPLC

1. หลักการวิเคราะห์

โครมาโทกราฟีของเหลวแรงดันสูง หรือ HPLC ประกอบด้วยคอลัมน์ ที่สามารถดูดซับสารอื่น ๆ ได้ โดยสารแต่ละชนิดมีความสามารถในการละลายและดูดซับได้ไม่เท่ากัน ทำให้เกิดการแยกภายใต้ความเข้มข้น และอัตราการไหลของตัวชะที่เหมาะสม เมื่อสารออกจากคอลัมน์จะเข้าสู่เครื่องตรวจจับ จากนั้นเครื่องตรวจจับ จะส่งสัญญาณไปที่เครื่องบันทึกข้อมูล ซึ่งแสดงข้อมูลที่ได้ออกมาเป็นพีค (peak) โดยพื้นที่ใต้พีคนี้จะเป็น สัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของกลีเซอรอลในสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไป

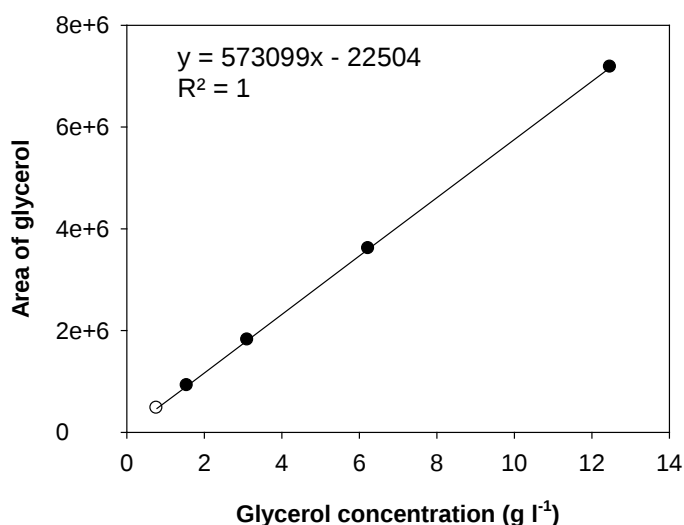
สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์กลีเซอรอล

1. ตัวชะ : 5 มิลลิโมลาร์ (mM) กรดซัลฟูริก
2. อัตราการไหล : 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที
3. อุณหภูมิเตาอบ : 40 องศาเซลเซียส
4. คอลัมน์ : Aminex HPX-87H
5. ตัวตรวจจับ : RI-Detector

โดยฉีดตัวอย่างที่ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และกลีเซอรอลจะถูกชะออกมาที่เวลา 12.973 นาที

2. วิธีวิเคราะห์ (Sirisantimethakom และคณะ, 2008)

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกลีเซอรอล 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 และ 12.48 กรัมต่อลิตร โดยใช้ น้ำกลั่น 2 ขั้นตอน หรือน้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย
2. ฉีดสารละลายมาตรฐานที่เตรียมในข้อ 1 เข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จะได้โครมาโตแกรมดังรูปที่ ผ.7 อ่านค่าพื้นที่ใต้พีคของความเข้มข้นนั้นๆ
3. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นของกลีเซอรอล (รูปที่ ผ.4)
4. ฉีดสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร อ่านค่าพื้นที่ใต้พีคที่ได้ และคำนวณความเข้มข้นของกลีเซอรอลจากกราฟมาตรฐาน



รูปที่ ผ.4 กราฟมาตรฐานของกลีเซอรอลโดยใช้ HPLC

ภาคผนวก 5

การวัดการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี Microscopic count

Heamacytometer เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับนับเม็ดเลือดแดงแต่ได้นำมาประยุกต์ในการนับจำนวนจุลินทรีย์และสปอร์ของเรา เครื่องมือนี้เป็นสไลด์มีช่องแบ่งไว้แน่นอน และมีขอบยกสูงจากบริเวณขีดเมื่อปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ขอบนี้จะรองรับกระจกปิดสไลด์ไว้ ทำให้เกิดระยะห่างจากกระจกปิดสไลด์ ในบริเวณที่ขีดคิดเป็นความลึกได้ 0.1 หรือ 0.2 มิลลิเมตร แล้วแต่บริษัทผู้ผลิต ขีดแบ่งที่กำหนดไว้ประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 25 ช่อง แต่ละช่องมีขนาด 0.2×0.2 ตารางมิลลิเมตร ในแต่ละช่องใหญ่นี้ มีขีดแบ่งเป็นช่องเล็กอีก 16 ช่อง แต่ละช่องมีเนื้อที่ 0.05×0.05 ตารางมิลลิเมตร (รูปที่ ผ.5) ดังนั้นของเหลวที่บรรจุอยู่ในแต่ละช่องเล็กจะมีปริมาตร 0.00025 ($0.05 \times 0.05 \times 0.1$) ลูกบาศก์มิลลิเมตร เครื่องมือนี้จะมีกระจกปิดสไลด์ซึ่งมีขนาดและความหนาเฉพาะ ไม่ควรใช้กระจกปิดสไลด์อื่นแทน เนื่องจากน้ำหนักของกระจกจะมีผลทำให้ปริมาตรภายในช่องระหว่างสไลด์กับกระจกผิดไปได้ และเมื่อใช้กระจกที่หนา จะเป็นอุปสรรคต่อการโฟกัสกล้อง

ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ควรเจือจางให้อยู่ในระดับที่สามารถตรวจนับจุลินทรีย์ในแต่ละช่องใหญ่ (16 ช่องเล็กภายใน) ได้ในระหว่าง 10 – 50 เซลล์ ทำการนับในช่องใหญ่นี้เป็นจำนวน 5 ช่อง (บริเวณหัวมุม 4 ช่อง และตรงกลาง 1 ช่อง) แล้วนำค่ามาเฉลี่ย

1. การตรวจนับ

- 1) ล้างเครื่องมือให้สะอาด เช็ดให้แห้ง
- 2) ปิดทับบริเวณสี่เหลี่ยมซึ่งมีช่องแบ่งด้วยกระจกปิดสไลด์
- 3) ใช้ปิเปตและลูกยางดูดตัวอย่าง และปลายปิเปตด้านแหลมที่มีช่องว่างระหว่างสไลด์ และกระจกปิดสไลด์ ค่อยปล่อยตัวอย่างให้ซึมเข้าไปในบริเวณช่อง ซึ่งกำหนดปริมาตรดังกล่าวไว้ข้างต้น
- 4) ตรวจนับโดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 40 เท่า
- 5) นับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็ก ควรตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งสิ้นไม่น้อยกว่า 5 ช่องใหญ่ (16 ช่องเล็ก) โดยจำนวนสปอร์ในแต่ละช่องควรมีค่าอยู่ระหว่าง 10 – 50 สปอร์

การคำนวณปริมาณจุลินทรีย์

รวมจำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้จากแต่ละช่องใหญ่ จะได้ X เซลล์ต่อช่อง (ควรได้ 10 – 50 เซลล์)

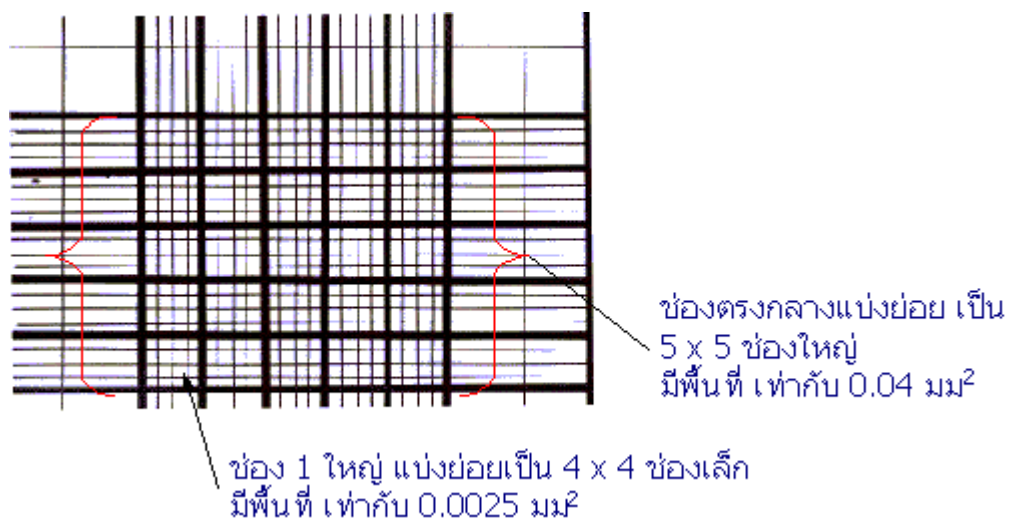
คำนวณจุลินทรีย์ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิตร ได้ดังนี้

การตรวจนับจาก 5 ช่องใหญ่ (มี 16 ช่องเล็กภายใน)

ตัวอย่าง ที่มีปริมาตร $\frac{1}{5}$ มิลลิตร (กว้าง) $\times \frac{1}{5}$ มิลลิตร (ยาว) $\times \frac{1}{10}$ มิลลิตร (สูง) $\times 5$ (ช่อง)

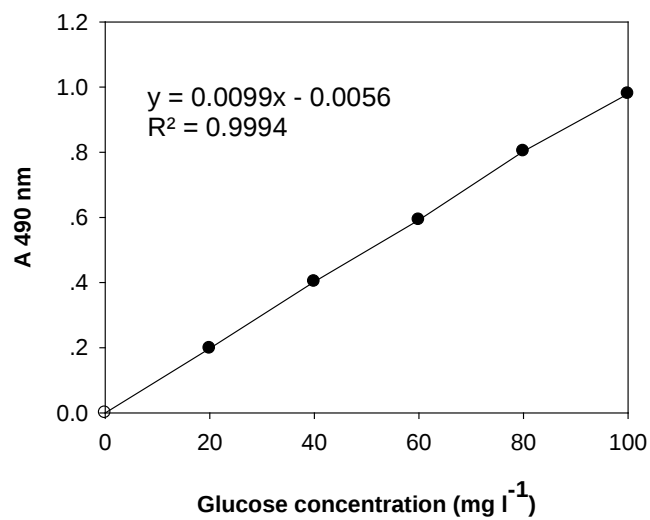
ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีจุลินทรีย์ = X เซลล์

= $X \times 5 \times (10^4) \times \text{dilution factor}$ (ค่าที่เจือจางเชื้อ) เซลล์ต่อมิลลิตร

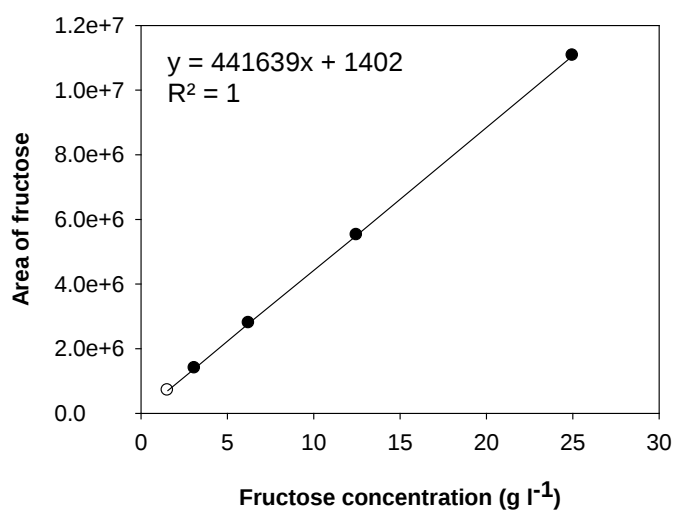


รูปที่ ผ.5 ตัวอย่างช่องสี่เหลี่ยมภายในสไลด์ (บริเวณแรงเงาเป็นบริเวณ 1 ช่องใหญ่ ที่มี 16 ช่องเล็กภายใน)
(http://agro-industry.rmutsv.ac.th/bioreactor/lectures/ferm1/bioferm2_2121.html)

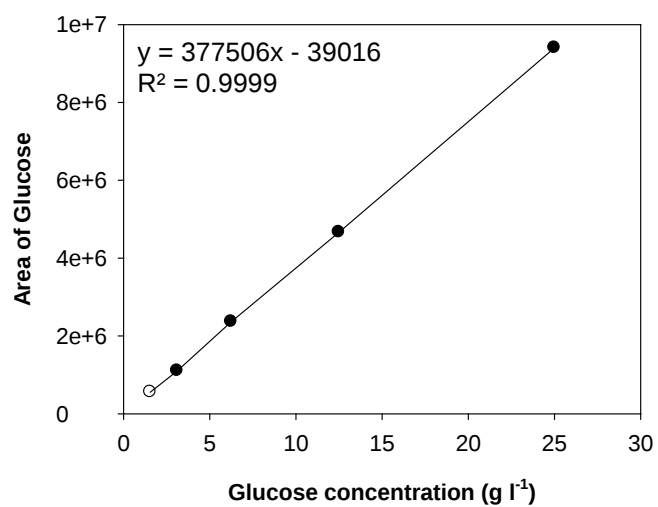
ภาคผนวก 6
กราฟมาตรฐานและโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน



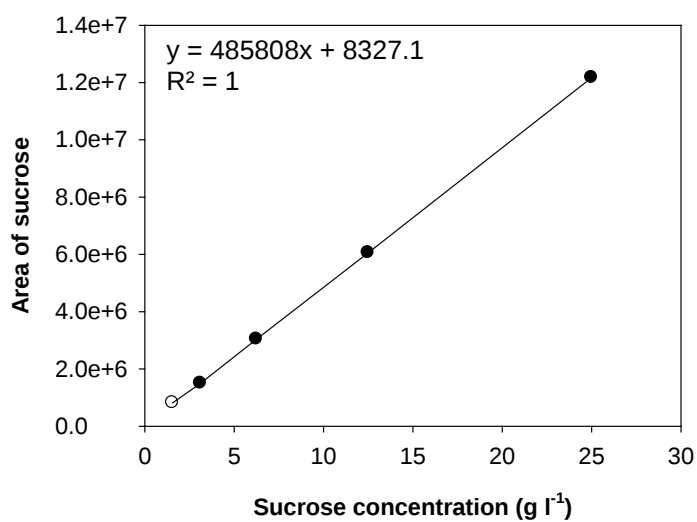
รูปที่ ผ.6 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด



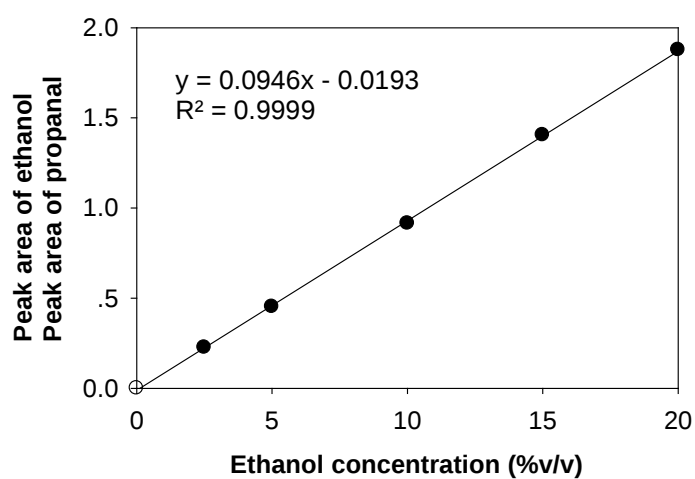
รูปที่ ผ.7 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลฟรุคโตสสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลฟรุคโตส



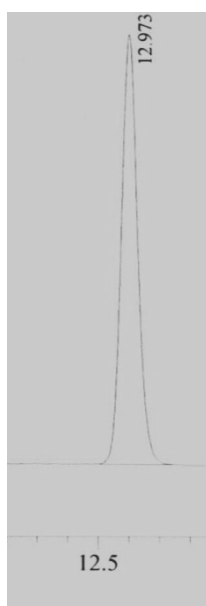
รูปที่ ๗.8 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคส



รูปที่ ๗.9 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครสสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลซูโครส



รูปที่ ผ.10 กราฟมาตรฐานของเอทานอลโดยใช้แก๊สโครมาโตกราฟี



รูปที่ ผ.11 โครมาโตแกรมของกลีเซอรอลมาตรฐาน (12.973 นาที)