

ภาคผนวกที่ 1

การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดทั้งหมดโดยวิธี Phenolic and concentrate sulfuric acid

การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีนี้ สามารถตรวจวัดปริมาณน้ำตาลช่วง 1 – 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และเป็นวิธีการที่รวดเร็วที่จะวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่จำเพาะเจาะจง เพราะไม่ว่าน้ำตาลนั้นจะอยู่ในรูปน้ำตาลรีดิคัล น้ำตาลอนรีดิคัล หรือน้ำตาลในธรรมชาติที่พบอยู่ในรูป mono-, di-, tri-, oligo- และ polysaccharide สามารถวิเคราะห์หาน้ำตาลได้ด้วยวิธีนี้

1. หลักการทางปฏิกิริยา (Scherz and Bonn, 1998)

น้ำตาล mono-, di-, tri-, oligo- และ polysaccharide ทำปฏิกิริยากับฟีนอล และกรดซัลฟูริกเข้มข้น ที่อุณหภูมิสูง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นสารที่มีสี สามารถดูดซับแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 480 – 490 นาโนเมตร สำหรับกลไกการเกิดปฏิกิริยา เชื่อว่าในกรณีน้ำตาล oligo- และ polysaccharide ถูกตัดพันธะอีเธอร์ระหว่างโมเลกุลให้ออกจากกันด้วยกรด พร้อมกันนั้น ก็เกิดปฏิกิริยาการขจัดน้ำออกที่แทนที่ด้วยอนุพันธ์ของเฟอร์ฟูรอล (furfural derivatives) ที่จะเกิดการรวมตัวกับฟีนอล กลายเป็นสีไตรเออร์มีเทน เป็นสารประกอบสีส้ม (triaryl methane dyes)

2. สารเคมี

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

3. วิธีการวิเคราะห์

- 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 แล้วเขย่าแรงๆ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) (ระวังกรดผสมน้ำจะร้อนเดือด) ตั้งทิ้งไว้อีกประมาณ 20 นาที
- 4) นำชุดทดลองไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เทียบความเข้มข้นกับสารละลายมาตรฐาน (standard curve) ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน และค่าการดูดกลืนแสง

4. ปัญหาที่เกิดขึ้นและแนวทางแก้ไข

- 1) ค่าที่ได้ไม่แน่นอน แก้ไขโดยพยายามควบคุมการทดลองให้เหมือนกันทุกครั้ง ซึ่งต้องไปปรับวิธีการตามความเหมาะสม และเพื่อให้ได้ค่าที่แม่นยำควรทำการทดลองซ้ำและควรมีการทำชุดสารละลายมาตรฐานควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง

- 2) กรดเข้มข้นละลายน้ำแล้วคายความร้อน จะมีอุณหภูมิสูง และมีฤทธิ์กัดกร่อนควรทำการทดลองด้วยความระมัดระวัง

5. การคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

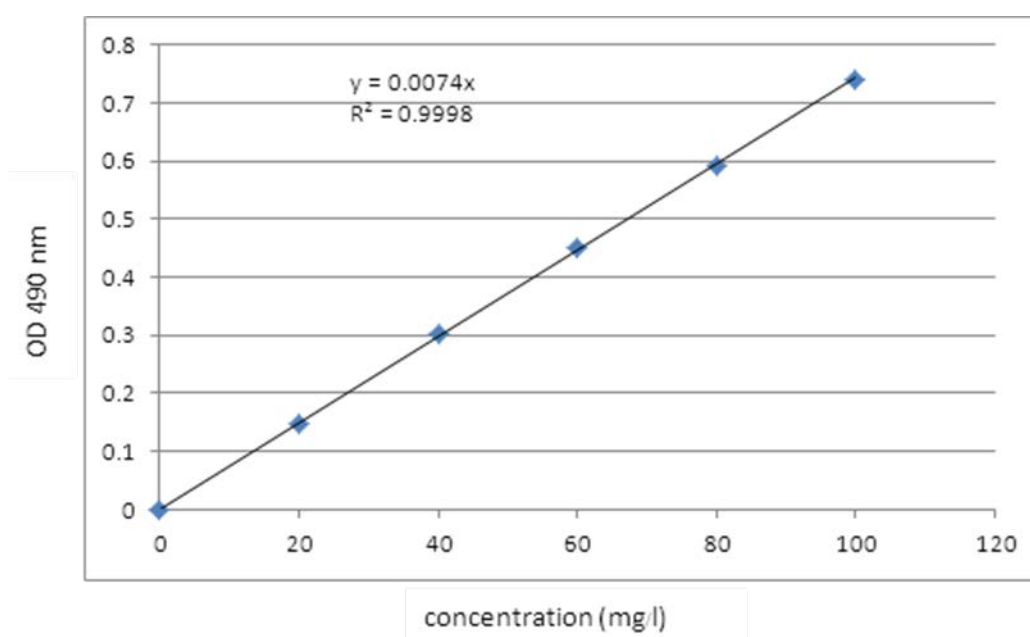
$$\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)} = \text{ค่าการดูดกลืนแสง (OD}_{490}) \times \frac{1}{\text{ความเข้มข้น}} \times \frac{1}{\text{การเจือจาง}}$$

โดย ความเข้มข้น = ค่าความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน

และการเจือจาง = ค่าเจือจางตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

ภาคผนวกที่ 2

กราฟมาตรฐานของการหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

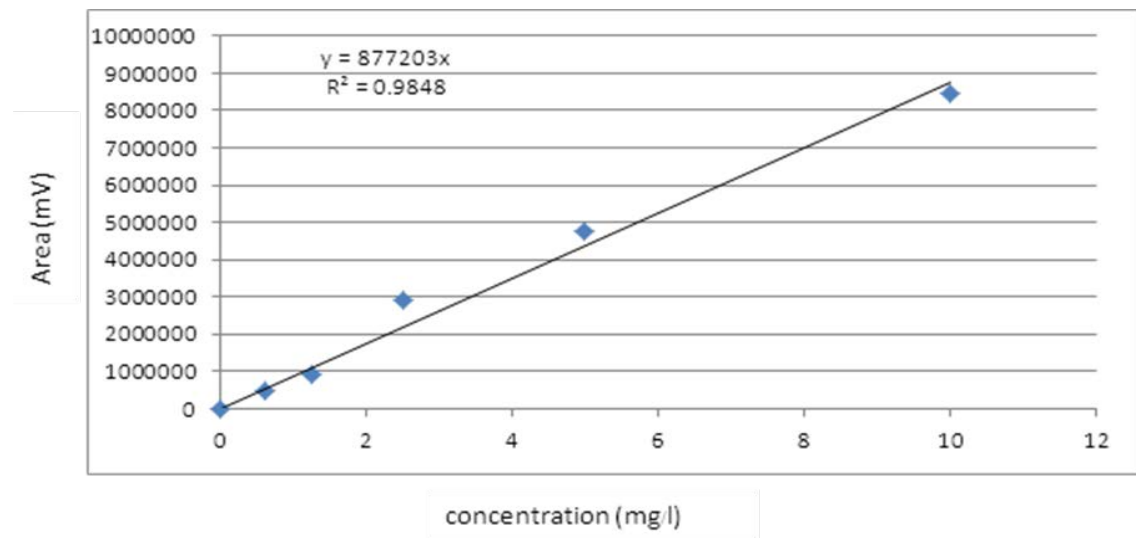


รูปที่ ผ.1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ภาคผนวกที่ 3

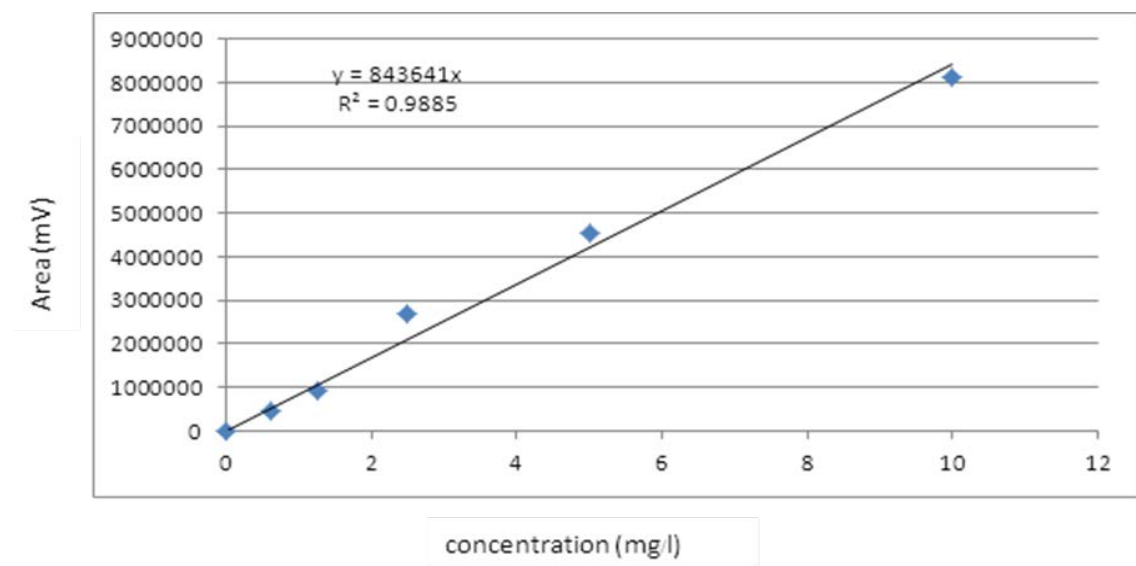
กราฟมาตรฐานของน้ำตาลชนิดต่างๆ

3.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส



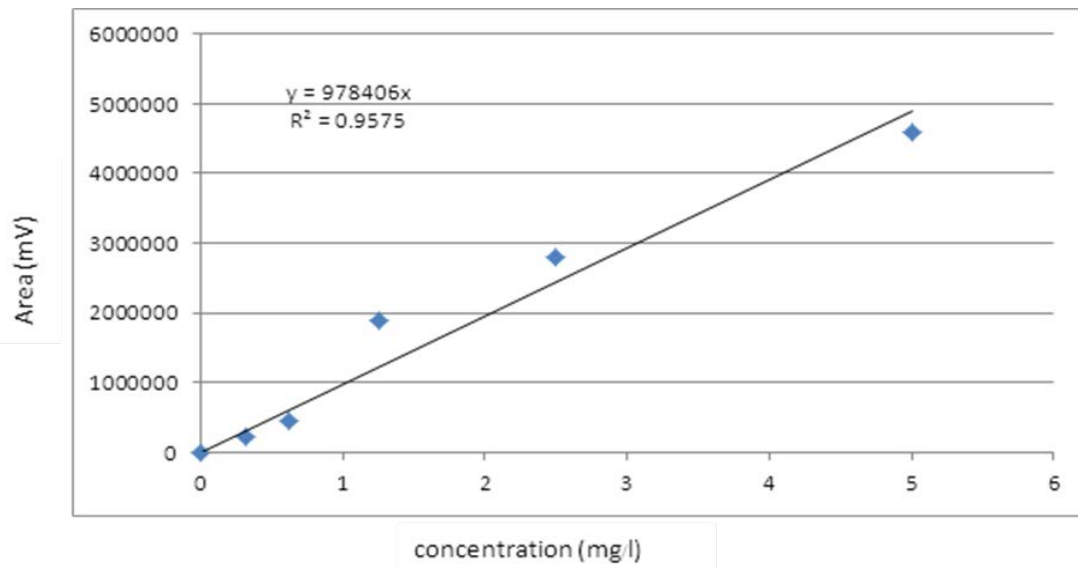
รูปที่ ผ.2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำตาลกลูโคสกับพื้นที่ใต้พีค

3.2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส



รูปที่ ผ.3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำตาลไซโลสกับพื้นที่ใต้พีค

3.3 กราฟมาตรฐานน้ำตาลอะราบินอส

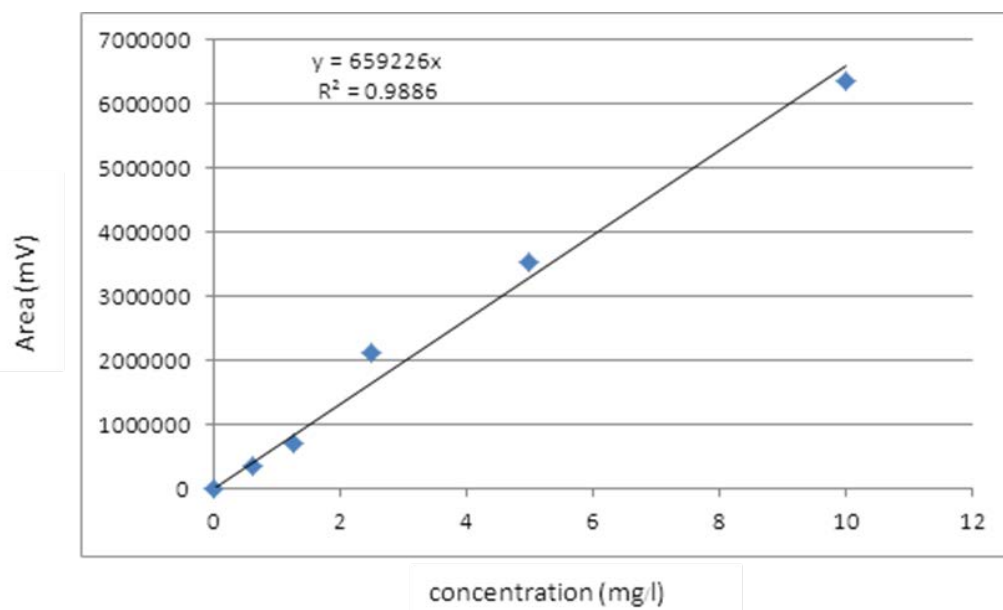


รูปที่ ผ.4 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำตาลอะราบินอสกับพื้นที่ใต้พีค

ภาคผนวกที่ 4

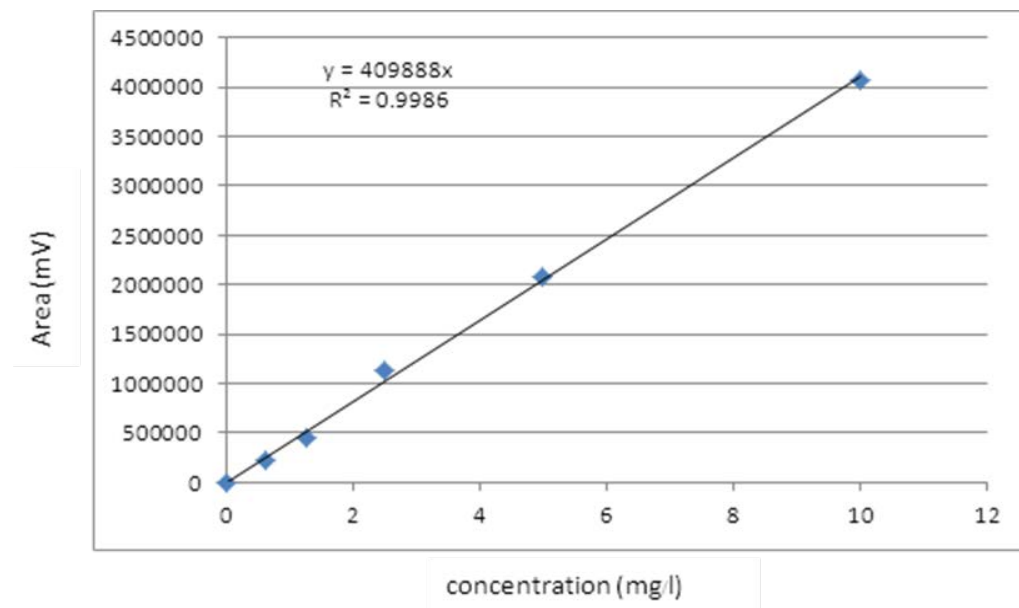
กราฟมาตรฐานของกรด เอทานอล และ 2,3-บิวเทนไดออล

4.1 กราฟมาตรฐานกรดแลคติก



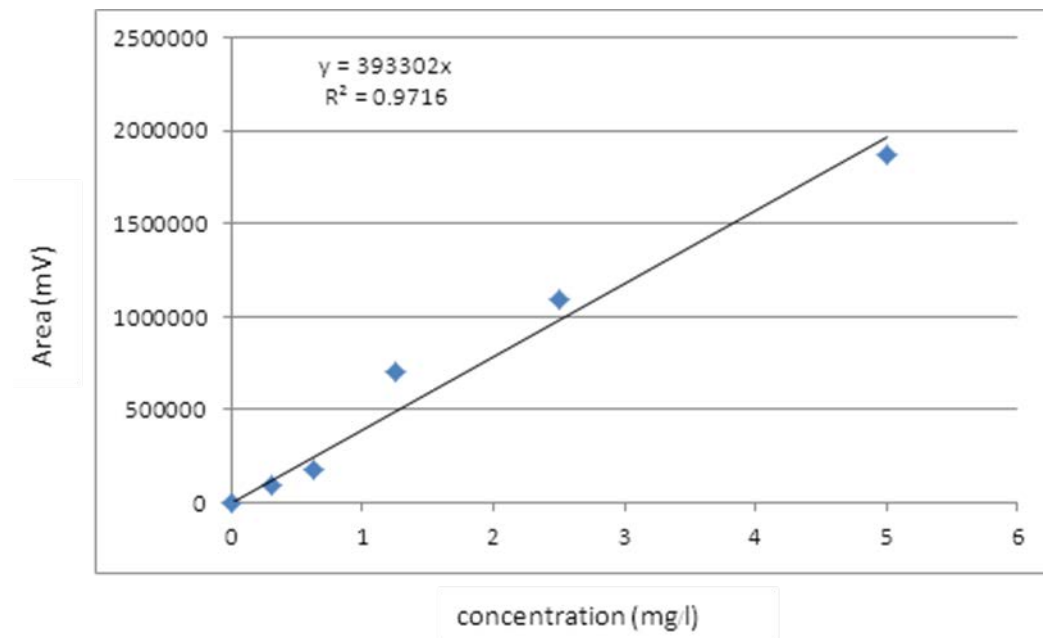
รูปที่ ผ.5 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกรดแลคติกกับพื้นที่ใต้พีค

4.2 กราฟมาตรฐานกรดอะซิติก



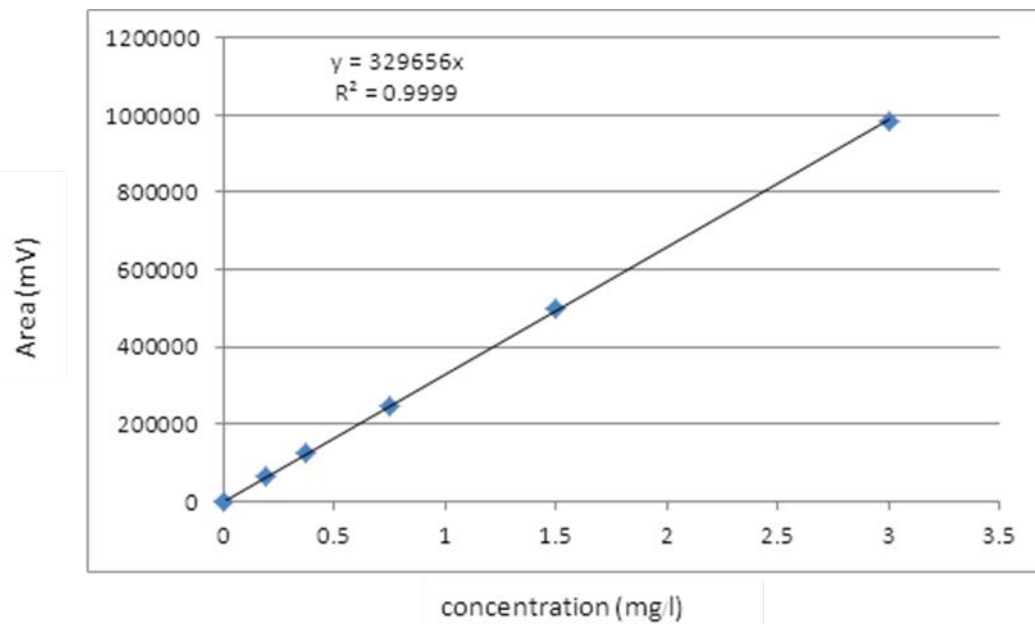
รูปที่ ๗.6 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกรดอะซิติกกับพื้นที่ใต้พีค

4.3 กราฟมาตรฐานกรดฟอร์มิก



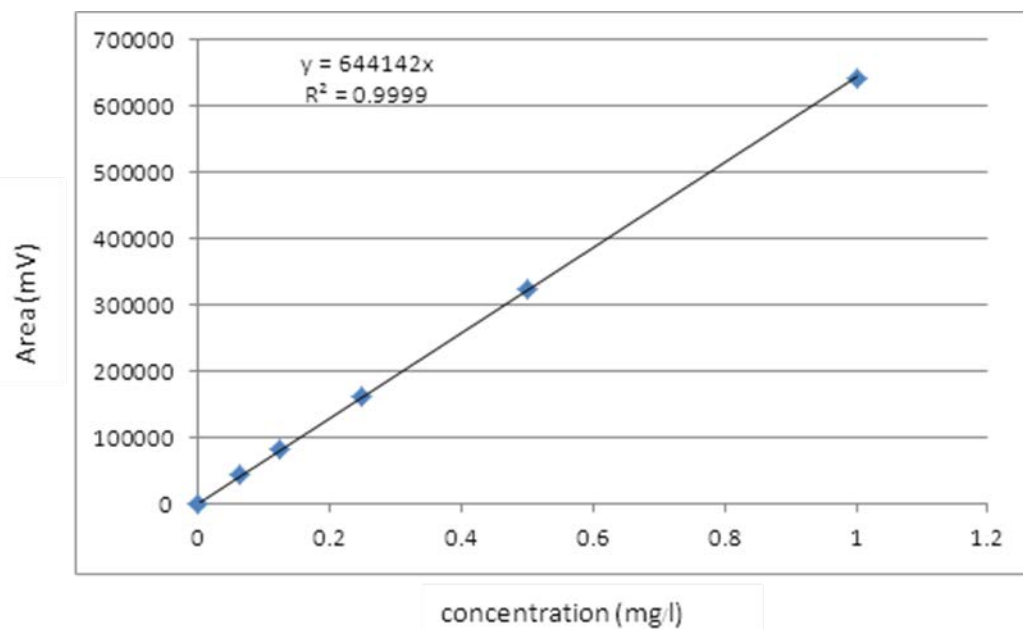
รูปที่ ๗.7 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกรดฟอร์มิกกับพื้นที่ใต้พีค

4.4 กราฟมาตรฐานเอทานอล



รูปที่ ผ.8 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเอทานอลกับพื้นที่ใต้พีค

4.5 กราฟมาตรฐาน 2,3-บิวเทนไดออล



รูปที่ ผ.9 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง 2,3-บิวเทนไดออลกับพื้นที่ใต้พีค

ภาคผนวกที่ 5

ตารางที่ ผ.1 ความเข้มข้นของน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ในระหว่างการหมักกรดแลคติกจากไฮโดรไลเสทชานข้าวฟ่างหวานที่ไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษ โดย *Lc. lactis* IO-1 โดยไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน

Time (h)	Concentrations (g/l)							
	glucose	xylose	arabinose	lactic acid	formic acid	acetic acid	ethanol	2,3-butanediol
0	1.39	27.6	1.14	0	0	0	0	0
6	1.21	27.35	0.94	1.56	1.13	1.2	1.25	0.15
12	0.47	25.49	0.35	2.06	1.57	3.56	1.87	0.75
24	0.2	23.97	0.15	3.51	1.91	5.71	2.95	2.77
36	0.19	9.04	0.1	9.02	3.66	6.11	4.04	3.03
48	0.18	3.76	0.07	10.09	4.57	7.01	5.12	3.57
72	0.15	3.56	0.07	10.11	4.61	7.04	5.13	3.53

ตารางที่ ผ.2 ความเข้มข้นของน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ในระหว่างการหมักกรดแลคติกแบบกะจากไฮโดรไลเสทชานข้าวฟ่างหวานโดย *Lc. lactis* IO-1 และเติมยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ 7 กรัมต่อลิตร

Time (h)	Concentrations (g/l)							
	glucose	xylose	arabinose	lactic acid	formic acid	acetic acid	ethanol	2,3-butanediol
0	1.70	29.18	1.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	1.54	27.89	1.05	1.95	2.43	1.65	1.78	0.23
12	1.45	27.30	0.36	3.65	3.66	5.75	1.92	0.29
24	0.24	22.46	0.32	5.29	5.22	6.77	3.30	2.09
36	0.15	5.06	0.08	13.14	5.76	9.48	3.64	3.90
48	0.09	3.32	0.07	14.80	5.89	9.48	3.68	4.02
72	0.08	0.16	0.06	14.85	6.03	9.50	3.61	4.04
96	0.08	0.53	0.06	14.88	6.10	9.52	3.37	4.15

ตารางที่ ผ.3 ความเข้มข้นของน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ในระหว่างการหมักกรดแลคติกจากไฮโดรไลเสทชานข้าวฟ่างหวานโดย *Lc. lactis* IO-1 และเติมกากเซลล์ยีสต์แห้ง 10.5 กรัมต่อลิตร

Time (h)	Concentrations (g/l)							
	glucose	xylose	arabinose	lactic acid	formic acid	acetic acid	ethanol	2,3-butanediol
0	0.69	26.95	0.76	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
6	0.63	26.43	0.75	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
12	0.0	25.32	0.74	0.90	0.0	0.0	0.84	0.0
24	0.0	20.75	0.72	3.19	0.65	1.56	0.88	0.0
36	0.0	16.97	0.71	6.11	0.77	2.49	0.93	0.52
48	0.0	12.46	0.71	7.47	0.78	3.00	0.94	0.80
72	0.0	8.34	0.71	8.01	0.80	3.75	1.15	1.61
96	0.0	7.09	0.67	8.15	0.81	3.87	1.22	2.18

ตารางที่ ผ.4 ความเข้มข้นของน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ในระหว่างการหมักกรดแลคติกจากไฮโดรไลเสทชานข้าวฟ่างหวานโดย *Lc. lactis* IO-1 และเติมกากเซลล์ยีสต์แห้ง 21 กรัมต่อลิตร

Time (h)	Concentrations (g/l)							
	glucose	xylose	arabinose	lactic acid	formic acid	acetic acid	ethanol	2,3-butanediol
0	0.69	26.09	0.70	0.27	0.0	0.0	0.0	0.0
6	0.63	25.73	0.71	0.65	0.0	0.0	0.0	0.0
12	0.0	23.53	0.58	1.66	0.75	1.09	1.05	0.31
24	0.0	11.80	0.57	8.97	1.15	3.18	1.58	0.69
36	0.0	5.38	0.57	13.16	1.17	4.10	2.02	0.92
48	0.0	2.65	0.57	14.42	1.19	4.39	2.10	1.07
72	0.0	1.61	0.57	15.12	1.22	4.77	2.26	1.16
96	0.0	0.0	0.57	15.34	1.23	4.82	2.28	1.21

ตารางที่ พ.5 ความเข้มข้นของน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ในระหว่างการหมักกรดแลคติกจากไฮโดรไลเสทชานข้าวฟ่างหวานโดย *Lc. lactis* IO-1 และเติมกากเซลล์ยีสต์แห้ง 31.5 กรัมต่อลิตร

Time (h)	Concentrations (g/l)							
	glucose	xylose	arabinose	lactic acid	formic acid	acetic acid	ethanol	2,3-butanediol
0	0.63	28.26	0.62	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
6	0.0	28.01	0.60	0.51	0.0	0.0	0.0	0.65
12	0.0	24.50	0.59	2.40	1.01	1.44	1.22	0.69
24	0.0	9.22	0.58	11.11	1.55	3.77	1.94	0.83
36	0.0	2.67	0.56	14.69	1.60	4.78	1.99	1.57
48	0.0	0.0	0.50	15.31	1.62	5.00	2.16	1.79
72	0.0	0.0	0.48	15.31	1.62	5.01	2.16	1.81
96	0.0	0.0	0.47	15.31	1.62	5.01	2.16	1.81

ตารางที่ พ.6 ความเข้มข้นของน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ในระหว่างการหมักกรดแลคติกจากไฮโดรไลเสทชานข้าวฟ่างหวานโดย *Lc. lactis* IO-1 และเติมรำข้าว 43.2 กรัมต่อลิตร

Time (h)	Concentrations (g/l)							
	glucose	xylose	arabinose	lactic acid	formic acid	acetic acid	ethanol	2,3-butanediol
0	1.49	29.32	0.64	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
6	1.27	27.54	0.62	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
12	0.33	27.38	0.61	2.86	0.0	0.0	0.0	0.0
24	0.0	25.74	0.46	3.92	0.45	1.04	0.77	0.0
36	0.0	23.12	0.45	4.76	0.77	1.71	1.00	0.0
48	0.0	22.06	0.43	5.30	0.98	2.14	1.03	0.0
72	0.0	20.62	0.43	5.44	1.12	2.54	1.05	0.0
96	0.0	20.19	0.41	5.46	1.14	2.58	1.11	0.29

ตารางที่ ผ.7 ความเข้มข้นของน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ในระหว่างการหมักกรดแลคติกจากไฮโดรไลเสทชานข้าวฟ่างหวานโดย *Lc. lactis* IO-1 และเติมรำข้าว 86.4 กรัมต่อลิตร

Time (h)	Concentrations (g/l)							
	glucose	xylose	arabinose	lactic acid	formic acid	acetic acid	ethanol	2,3-butanediol
0	2.50	29.60	0.69	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
6	0.91	27.49	0.57	2.28	0.0	0.0	1.31	0.0
12	0.59	25.49	0.55	5.45	0.77	1.24	1.98	0.0
24	0.0	21.07	0.50	7.45	1.26	2.50	2.03	0.0
36	0.0	16.34	0.48	8.42	1.39	3.26	2.19	0.0
48	0.0	15.75	0.48	9.09	1.41	3.58	2.23	0.0
72	0.0	14.66	0.46	9.80	1.57	3.99	2.31	0.0
96	0.0	12.39	0.46	10.05	1.64	4.10	2.46	0.0