ภาคผนวก

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

1. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ด้วยวิธี Somogyi-Nelson, (1944) (Dubios *et al.*,1956)

สารเคมี

- สารละลายกลูโคสมาตรฐาน
- Alkaline copper reagent
- Nelson reagent

วิธีการ

1.1. การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคสของการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

1.1.1 เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 1000 μg/ml

1.1.2 นำสารละลายน้ำตาลกลูโคส1000 μg/ml มาทำให้เจือจางให้มีความเข้มข้น 40, 80, 120, 160 และ 200 μg/ml แสดงดังตารางข้างล่างนี้

ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (μg/ml)	ปริมาณน้ำกลั่น (ml)	ปริมาณสารละลายน้ำตาลกลูโคส 1000 μg/ml (ml)
40	48	2
80	46	4
120	44	6
160	42	8
200	40	10

1.1.3 ดูดสารละลายที่เตรียมได้ 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง

1.1.4 เติม Alkaline copper reagent 1 ml ผสมให้เข้ากัน

1.1.5 นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 15 นาที

1.1.6 นำไปทำให้เย็นใน Ice bath

1.1.7 เติม Nelson reagent 1 ml ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

1.1.8 เติมน้ำกลั่น 5 ml ผสมให้เข้ากัน

1.1.9 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

1.10 Plot graph ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของน้ำตาล โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่แกน Y และความเข้มข้นของน้ำตาลอยู่แกน X หาค่าความชันจากกราฟที่ได้

1.2.การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากตัวอย่าง

1.2.1 ดูดตัวอย่าง (สารละลายสตาร์ชกล้วยก่อนและหลังการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ pullanase ดังข้อ 2.3.2/ สารละลายส่วนใสของสตาร์ชกล้วยที่ผ่านการถูกย่อยด้วยเอนไซม์หรือกรด ดังข้อ 2.6 และ 2.7) อย่างละ 1 ml ใส่ลงไปในหลอดทดลอง

1.2.2 ทำการทดลองดังข้อ 1.1.4 – 1.19

1.3.การคำนวณ

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ } (\mu g/ml) = \frac{Ab_{520} \text{ X Dil}}{\text{Slope}}$$

Ab_{520} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

Dil คือ Dilution

Slope คือ ค่าความชันจากกราฟมาตรฐานกลูโคสของการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

2. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ด้วยวิธี Phenol-Sulfuric Reaction (Dubios *et al.*,1956)

สารเคมี

- สารละลายซัลฟูริกเข้มข้น
- Phenol solution ความเข้มข้นร้อยละ 0.5

วิธีการ

2.1. การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคสของการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

2.1.1 เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 100 μg/ml

2.1.2 นำสารละลายน้ำตาลกลูโคส 100 μg/ml มาทำให้เจือจางให้มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 g/ml แสดงดังตารางข้างล่างนี้

ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (μg/ml)	ปริมาณน้ำกลั่น (ml)	ปริมาณสารละลายน้ำตาลกลูโคส 100 μg/ml (ml)
20	8	2
40	6	4
60	4	6
80	2	8

2.1.3 ดูดสารละลายที่เตรียมได้ 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง

2.1.4 ใส่สารละลาย 5% phenol ลงในหลอดทดลอง 1 ml ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วด้วย mixer

2.1.5 ใส่สารละลายซัลฟูริกเข้มข้น 5 ml ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วด้วย mixer

2.1.6 ตั้งทิ้งไว้ในตู้ดูดควันเป็นเวลา 30 นาที

2.1.7 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร

2.1.8 Plot graph ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของน้ำตาล โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่แกน Y และความเข้มข้นของน้ำตาลอยู่แกน X หาค่าความชันจากกราฟที่ได้

2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากตัวอย่าง

2.2.1 ดูดตัวอย่าง (สารละลายสตาร์ชกล้วยที่ผ่านการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ pullulanase ดังข้อ 2.3.2/ สารละลายสตาร์ชกล้วยก่อนการดัดแปรที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ซึ่งผ่านการให้ความร้อนในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที อย่างละ 1 ml ใส่ลงไปในหลอดทดลอง

2.2.2 ทำการทดลองดังข้อ 2.1 (ข้อ 2.1.4- 2.1.8)

2.3 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (μg/ml)} = \frac{Ab_{485} \times Dil}{Slope}$$

Ab_{485} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร

Dil คือ Dilution

Slope คือ ค่าความชันจากกราฟมาตรฐานกลูโคสของการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด