ภาคผนวก 1

การปรับปริมาณของแข็งละลาย

ปรับปริมาณของแข็งละลายในน้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยใช้น้ำตาลทราย และใช้ Hand refractometer วัดในหน่วยองศาบริกซ์ โดยคำนวณดังสมการ

$$\text{ปริมาณน้ำตาลทรายที่เติม (กิโลกรัม)} = \frac{\text{ปริมาณของแข็งละลายที่ต้องการ-ปริมาณของแข็งละลายที่วัดได้}}{100 - \text{ปริมาณของแข็งละลายที่ต้องการ}} \times \text{ปริมาตรสารละลาย (ลิตร)}$$

ตัวอย่างการคำนวณ

น้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวานมีปริมาณของแข็งละลายเริ่มต้น 18 องศาบริกซ์ ต้องการเตรียมน้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวานให้ได้ปริมาณของแข็งละลายเป็น 24 องศาบริกซ์ ปริมาตร 350 มิลลิลิตร ทำได้ดังนี้

จากสมการหา

$$\text{ปริมาณน้ำตาลทราย (กิโลกรัม)} = \frac{(24 \text{ องศาบริกซ์} - 18 \text{ องศาบริกซ์})}{100 - 24 \text{ องศาบริกซ์}} \times 0.35 \text{ ลิตร}$$

$$= 0.028 \text{ กิโลกรัม}$$

$$= 28 \text{ กรัม}$$

ดังนั้น ต้องเติมน้ำตาลทราย 28 กรัม ในน้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวานปริมาตร 350 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ภาคผนวก 2

การหาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solid) โดยใช้รีแฟรคโตมิเตอร์ (Refractometer)

วิธีการ

1) ใช้ผ้าสะอาดนุ่มชุบน้ำ ทำความสะอาดปริซึมของเครื่องรีแฟรคโตมิเตอร์และเช็ดให้แห้ง
2) หยดน้ำกลั่นลงบนปริซึม 1-2 หยด ปิดฝาครอบเพื่อให้น้ำกลั่นกระจายทั่วพื้นผิวของปริซึม 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) ใช้กระดาษเช็ดเลนส์เช็ดตัวอย่างที่ติดอยู่กับปริซึมออก แล้วทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นและเช็ดให้แห้ง

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

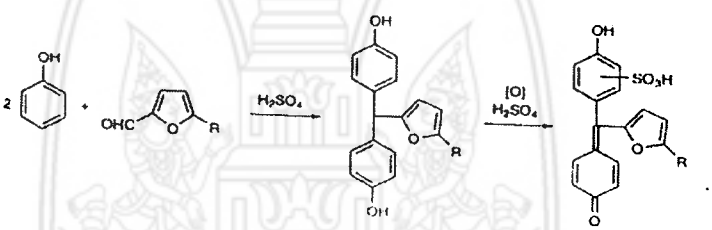
ภาคผนวก 3

การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดทั้งหมดโดยวิธี Phenolic and concentrate sulfuric acid

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

1. หลักการทางปฏิกิริยา (Scherz and Bonn, 1998)

น้ำตาล mono-, di-, tri-, oligo- และ polysaccharide ทำปฏิกิริยากับฟีนอล และกรดซัลฟูริคเข้มข้น ที่อุณหภูมิสูง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นสารที่มีสี สามารถดูดซับแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 480 – 490 นาโนเมตร สำหรับกลไกการเกิดปฏิกิริยา เชื่อว่าในกรณีน้ำตาล oligo- และ polysaccharide ถูกตัดพันธะอีเธอร์ระหว่างโมเลกุลให้ออกจากกันด้วยกรด พร้อมกันนั้น ก็เกิดปฏิกิริยาการขจัดน้ำออกที่แทนที่ด้วยอนุพันธุ์ของเฟอร์ฟูรอล (furfural derivatives) ที่จะเกิดการรวมตัวกับฟีนอลกลายเป็นสีไตรเอริลมีเทน เป็นสารประกอบสีส้ม (triarylmethane dyes)



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

2. สารเคมี

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

3. วิธีการวิเคราะห์

1) ใช้ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ขณะเดียวกันก็ทำกับสารไร้ตัวอย่าง (blank) ด้วย โดยการใช้น้ำกลั่นปริมาตรเท่ากันแทนตัวอย่าง
2) เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร ในตัวอย่างผสมให้เข้ากัน

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

4) นำชุดทดลองไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เทียบความเข้มข้นกับสารละลายมาตรฐาน (standard curve) ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน และค่าการดูกลืนแสง

4. ปัญหาที่เกิดขึ้นและแนวทางแก้ไข

1) ค่าที่ได้ไม่แน่นอน แก้ไขโดยพยายามควบคุมการทดลองให้เหมือนๆกันทุกครั้ง 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

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

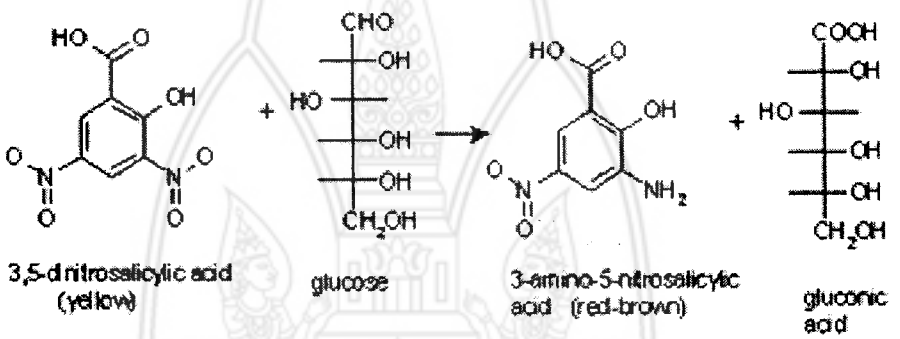
ภาคผนวก 4

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

วิธีการนี้สามารถใช้ตรวจหาปริมาณน้ำตาลพวก Reducing sugar ในช่วงระหว่าง 5-500 มิลลิกรัมต่อลิตร

1. หลักการทางปฏิกิริยา (Scherz and Bonn, 1998)

การต้มน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายด่างที่มีกรดไดไนโตรซาลิไซลิค ซึ่งสารตัวนี้จะเปลี่ยนรูปไปเป็นสารที่มีสีเข้มขึ้น ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นแสงช่วง 500-550 นาโนเมตร ปฏิกิริยานี้จะไม่หยุดจนกว่าจะเกิดผลิตภัณฑ์หมด เชื่อว่าสีของผลิตภัณฑ์นั้นเป็นสีของ 3-amino-5-nitrosalicylic acid



รูปที่ ผ. 2 ปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์และสาร 3,5- dinitrosalicylic acid ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีเข้มของ 3-amino-5- nitrosalicylic acid (ที่มา : http://biochem.ncsu.edu/faculty)

2. สารเคมี

- 2 N NaOH 50 มิลลิลิตร (เตรียมโดย ละลาย 4 กรัม NaOH ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร)
- DNS solution เตรียมโดยละลาย 3,5- dinitrosalicylic acid (DNS) 2.5 กรัม ลงใน 50 มิลลิลิตรของ 2 N NaOH เติม Sodium potassium tartrate (Rochelle salt) 70.55 กรัม และคนจนละลายหมดเติมน้ำให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 250 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิห้อง จะสามารถเก็บไว้ใช้ได้นานหลายอาทิตย์

3. วิธีวิเคราะห์

1) ดูดตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลจำนวน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง สำหรับหลอดที่ไม่มีสารตัวอย่าง (blank) ใช้น้ำกลั่น

2) เติม DNS solution 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3) ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที
4) ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว
5) เติมน้ำลงไป 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี
6) นำชุดทดลองไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟความเข้มข้นน้ำตาลมาตรฐาน (standard curve)

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ภาคผนวก 5

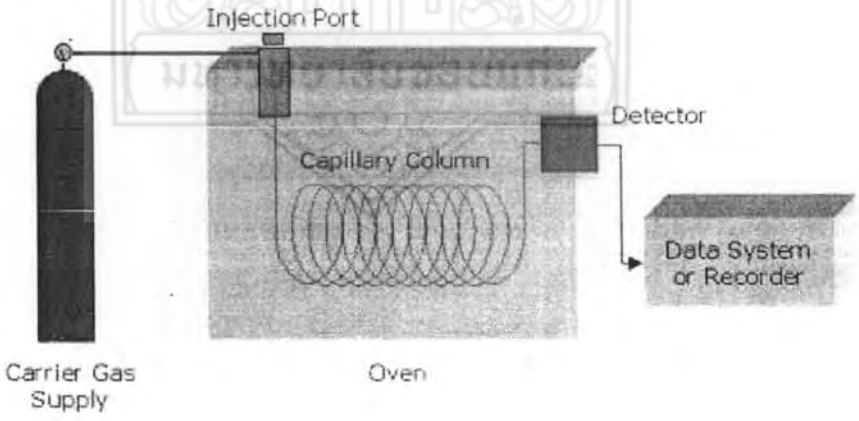
การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography method)

1. หลักการวิเคราะห์

ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์หรือเอทานอลที่ผลิตโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์นั้น มักจะวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี แก๊สโครมาโทกราฟีประกอบด้วยคอลัมน์ ที่สามารถดูดซับเอทานอลหรือแอลกอฮอล์อื่น ๆ ได้ ภายใต้อุณหภูมิและอัตราการไหลของแก๊สนำพา (ไนโตรเจน) ที่เหมาะสม กล่องควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ตั้งค่าไว้ที่ 150 องศาเซลเซียส และอัตราการไหลของแก๊สนำพาตั้งไว้ที่ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

สารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร ถูกฉีดเข้าไปในคอลัมน์ด้วยไมโครไซริง (mycrosyring) อย่างรวดเร็ว ตัวอย่างจะระเหยกลายเป็นไอทันที และถูกพาเข้าสู่คอลัมน์ ซึ่งในคอลัมน์นี้แอลกอฮอล์จะถูกแยกออกจากองค์ประกอบอื่น ๆ เมื่อไอระเหยออกจากคอลัมน์ก็จะเข้าสู่เครื่องตรวจวัด จากนั้นเครื่องตรวจวัดจะส่งสัญญาณไปที่เครื่องบันทึกข้อมูล ซึ่งแสดงข้อมูลที่ได้ออกมาเป็นพีค (peak) โดยพื้นที่ใต้พีคนี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอทานอลในสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไป

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



รูปที่ ผ. 3 Gas chromatography Block Diagram ในการวิเคราะห์หาเอทานอล
(ที่มา : http://depts.washington.edu/spectral/massspec/GCMSintro/)

2. วิธีการวิเคราะห์

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 5.5 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) ได้ X เปอร์เซนต์ (โดยปริมาตร)

นั่นคือ สารตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร มีปริมาณแอลกอฮอล์ $= X$ มิลลิลิตร

ถ้าสารตัวอย่าง 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 6

การวัดการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี Microscopic count

Heamacytometer เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับนับเม็ดเลือดแดงแต่ได้นับมาประยุกต์ในการนับจำนวนจุลินทรีย์และสปอร์ของรา เครื่องมือนี้เป็นสไลด์มีช่องแบ่งไว้แน่นอน และมีขอบยกสูงจากบริเวณขีดเมื่อปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ขอบนี้จะรองรับกระจกปิดสไลด์ไว้ ทำให้เกิดระยะห่างจากกระจกปิดสไลด์ในบริเวณที่ขีดคิดเป็นความลึกได้ 0.1 หรือ 0.2 มิลลิลิตร. แล้วแต่บริษัทผู้ผลิต ขีดแบ่งที่กำหนดไว้ประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัวใหญ่ 25 ช่อง แต่ละช่องมีขนาด 0.2 x 0.2 ตารางมิลลิเมตร ในแต่ละช่องใหญ่นี้ มีขีดแบ่งเป็นช่องเล็กอีก 16 ช่อง แต่ละช่องมีเนื้อที่ 0.05 x 0.05 ตารางมิลลิเมตร (รูปที่ ผ.4) ดังนั้นของเหลวที่บรรจุอยู่ในแต่ละช่องเล็กจะมีปริมาตร 0.00025 (0.05x0.05x0.1) ลูกบาศก์มิลลิลิตร เครื่องมือนี้จะมีกระจกปิดสไลด์ซึ่งมีขนาดและความหนาเฉพาะ ไม่ควรใช้กระจกปิดสไลด์อื่นแทน เนื่องจากน้ำหนักของกระจกจะมีผลทำให้ปริมาตรภายในช่องระหว่างสไลด์กับกระจกผิดไปได้ และเมื่อใช้กระจกที่หนา จะเป็นอุปสรรคต่อการโฟกัสกล้อง

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

1. การตรวจนับ

1) ล้างเครื่องมือให้สะอาด เช็ดให้แห้ง

2) ปิดทับบริเวณสีเหลี่ยมซึ่งมีช่องแบ่งด้วยกระจกปิดสไลด์

3) ใช้ปิเปตและลูกยางดูดตัวอย่าง แตะปลายปิเปตด้านแหลมที่มีช่องว่างระหว่างสไลด์ และกระจกปิดสไลด์ ค่อยปล่อยตัวอย่างให้ซึมเข้าไปในบริเวณช่อง ซึ่งกำหนดปริมาตรดังกล่าวไว้ข้างต้น

4) ตรวจนับโดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 40 เท่า

5) นับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็ก ควรตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งสิ้นไม่น้อยกว่า 5 ช่องใหญ่ (16 ช่องเล็ก) โดยจำนวนสปอร์ในแต่ละช่องควรมีค่าอยู่ระหว่าง 10 – 50 สปอร์

การคำนวณปริมาณจุลินทรีย์

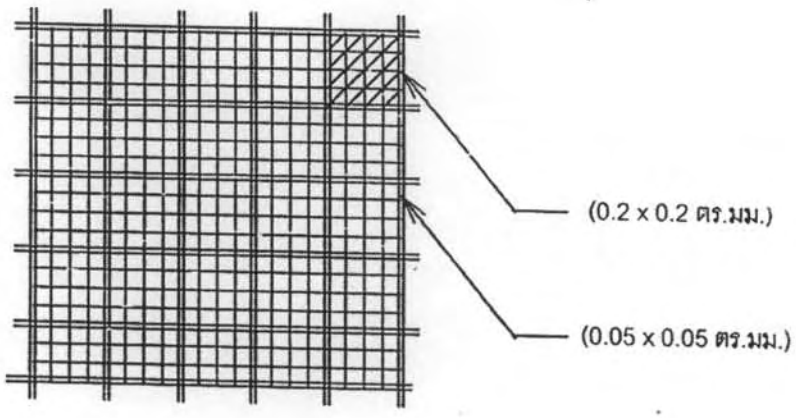
รวมจำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้จากแต่ละช่องใหญ่ จะได้ X เซลล์ต่อช่อง (ควรได้ 10 – 50 เซลล์)

คำนวณจุลินทรีย์ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ได้ดังนี้

การตรวจนับจาก 5 ช่องใหญ่ (มี16 ช่องเล็กภายใน)

ตัวอย่าง ที่มีปริมาตร 1/5 มิลลิลิตร (กว้าง) x 1/5 มิลลิลิตร (ยาว) x 1/10 มิลลิลิตร (สูง) x 5 (ช่อง) ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีจุลินทรีย์ = X เซลล์

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



รูป ผ.4 ตัวอย่างช่องสี่เหลี่ยมภายในสไลด์ (บริเวณแรงเงาเป็นบริเวณ 1 ช่องใหญ่ ที่มี 16 ช่องเล็กภายใน)

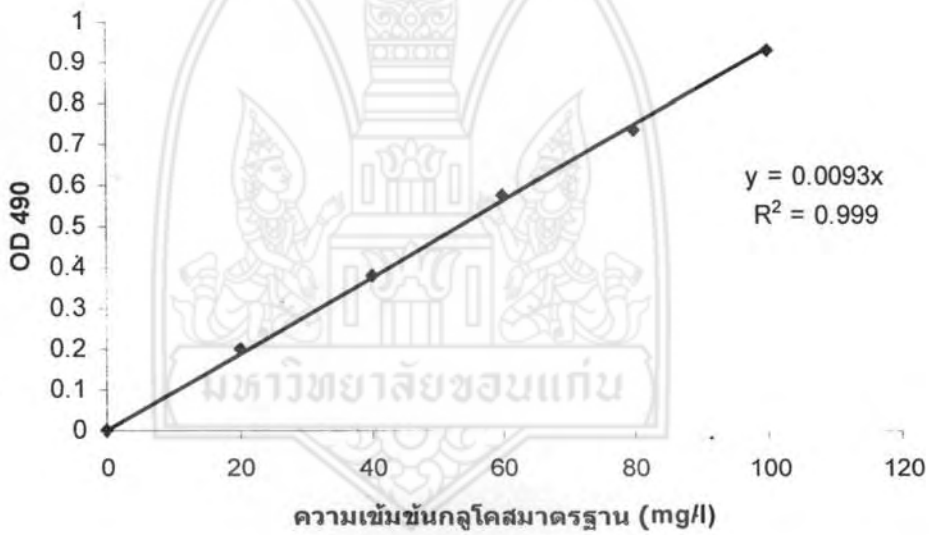
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ภาคผนวก 7

กราฟมาตรฐานของการหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ตารางที่ ผ.1 ข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (A_{490nm})		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
0	0	0	0
20	0.207	0.193	0.200
40	0.386	0.374	0.381
60	0.573	0.575	0.574
80	0.920	0.941	0.930

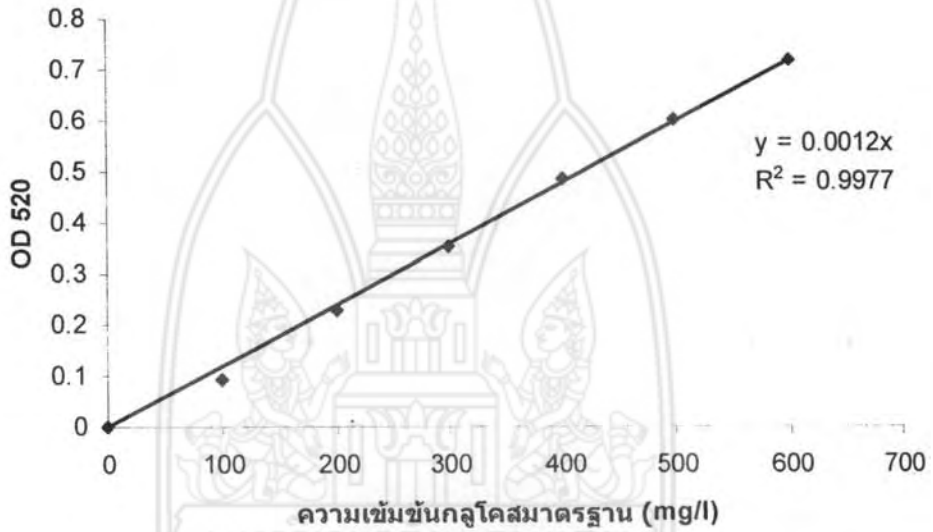


รูปที่ ผ.5 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสสำหรับใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ตาราง ผ.2 ข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

ความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (A_{520nm})		
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	เฉลี่ย
0	0	0	0
100	0.094	0.091	0.093
200	0.225	0.229	0.227
300	0.354	0.350	0.352
400	0.490	0.481	0.486
500	0.591	0.607	0.599
600	0.703	0.733	0.718



รูปที่ ผ.6 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสสำหรับใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์