ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม [11]

1. สูตรอาหารแข็งวายเอ็มเอ (Yeast malt agar ; YMA)

ส่วนประกอบอาหารแข็งวายเอ็มเอ มีดังนี้

ยีสต์เอ๊กแทร็ค (Yeat extract)	3.0	กรัม
มอลต์เอ๊กแทร็ค (Malt extract)	3.0	กรัม
เบคโต-เปปโตน (Bacto-peptone)	5.0	กรัม
กลุโคส (glucose)	20.0	กรัม
เอการ์ (Agar)	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

2. วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นบรรจุใส่ขวดแก้ว ทำการกวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยการให้ความร้อนจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งภายใต้ความดัน15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
เทคนิคในการเพาะเลี้ยงและการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ [11]

การเขี่ยและการถ่ายเชื้อนับว่าเป็นเทคนิคที่สำคัญมาก ในการที่จะขยายหรือเพิ่มเชื้อบริสุทธิ์ที่มีอยู่แล้วให้มีปริมาณมากขึ้น

1. ลักษณะของห้องเขี่ยเชื้อ

1.1 ควรเป็นห้องกะทัดรัดไม่ใหญ่เกินไป สามารถที่จะมีพื้นที่วางตู้เขี่ยเชื้อ อุปกรณ์ในการเตรียมเชื้อ

1.2 ดูแลไม่ให้ห้องปฏิบัติการเป็นแหล่งสะสมเชื้อ ต้องรักษาความสะอาดไม่ให้เกิด แหล่งสะสมฝุ่นละออง ไม่นำสิ่งที่ไม่จำเป็นเข้าห้อง และกำจัดขยะเสมอ

1.3 ป้องกันไม่ให้มีมด แมลง หรือสัตว์พาหะอื่นๆ มารบกวน

2. ข้อควรปฏิบัติในการเขี่ยเชื้อ

2.1 ควรล้างมือด้วยสบู่ให้สะอาด เช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70% จนถึงข้อศอก ก่อนและหลังเขี่ยเชื้อทุกครั้ง

2.2 เช็ดทำความสะอาดตู้เขี่ยเชื้อและโต๊ะเตรียมเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 โดยปริมาตรก่อนและหลังปฏิบัติงาน

2.3 ก่อนนำวัสดุหรืออุปกรณ์ใดเข้าตู้เขี่ยเชื้อ ให้เช็ดทำความสะอาดก่อนด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 โดยปริมาตรทุกครั้ง

2.4 หลังเลิกใช้งานตู้เขี่ยเชื้อทุกครั้งจะต้องนำหลอดอาหารที่มีเชื้ออยู่ออกมาก่อน แล้วค่อยเปิดไฟ UV ทิ้งไว้ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.5 หลอดอาหารที่ยังไม่ได้ใช้ให้ใส่ถุงพลาสติกแล้วมัดใส่ตู้เย็นไว้

2.6 การนำหลอดเพาะเลี้ยงเชื้อออกจากตู้เย็นมาใช้ต้องรอให้อุณหภูมิของหลอดลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องก่อนจะนำไปใช้งาน

2.7 ใช้ปากกาเขียนบนสติกเกอร์ติด บอก วัน เดือน ปี เวลาที่เขี่ยเชื้อเสมอ

3. เทคนิคการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

ในการเลี้ยงยีสต์บริสุทธิ์นั้นอาจมีการปนเปื้อนของเชื้ออื่นอยู่ก่อนบ้างแล้ว เพียงแต่เชื้อเหล่านั้นอาจยังมีปริมาณไม่มากพอที่จะเจริญครอบคลุมยีสต์ แต่ก็เจริญเติบโตไปพร้อมๆกันโดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย ที่มักทำให้เกิดปัญหาเรื่องการปนเปื้อนอยู่บ่อยๆ และเมื่อเกิดการปนเปื้อนในปริมาณมาก

ก็จะมีผลต่อประสิทธิภาพการหมักตามมาเช่น ทำให้เกิดการบูดเสีย ทำให้ยีสต์ไม่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้เพราะถูกแบคทีเรียยับยั้งการเจริญ วิธีแก้ไขคือต้องทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

3.1 ทำการฆ่าเชื้อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำใส่ถุงพลาสติกมัดด้วยยางรัด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.2 ทำการเตรียมอาหาร โดยบรรจุ อาหารแข็งวายเอ็มเอ (Yeast malt agar ; YMA) ในขวดลูกชมพู่ นำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที รอให้อาหารอุ่นๆประมาณ 40 องศาเซลเซียส

3.3 เทอาหารใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ โดยเทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate) ใส่ 1/4 ของจาน รอให้อาหารแข็งตัว

4. ขั้นตอนการเขี่ยเชื้อ (Cross strek)

4.1 ใช้ลวดเขี่ยเชื้อลนไฟให้แดง แล้วปล่อยให้เย็นนำไปตักเชื้อมา 1 ลูป มาแตะที่ผิววุ้นใกล้ๆ ขอบใดขอบหนึ่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลากลวดเขี่ยเชื้อเบาๆ (ทำโดยซิกแซ็กไปมา) ให้ใช้ด้านแบนของปลายลวดแตะแผ่วๆ บนผิววุ้นไปมา 4-5 เส้น แต่ละเส้นให้ใกล้กันที่สุด ระวังอย่าให้ลวดเขี่ยเชื้อฝังลงไปในเนื้อวุ้น ปิดฝาจาน

4.2 เผาลวดเขี่ยเชื้อให้แดง แล้วปล่อยให้เย็น

4.3 ปิดจานอาหารเขียนเลขบนจานและวางคว่ำไว้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-3 วัน จะมีโคโลนีของเชื้อเจริญขึ้น

5. การนำเชื้อที่ได้ไปใช้งาน

5.1 หลังจากที่โคโลนีปรากฏบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วให้สังเกตดูว่ามีสิ่งแปลกปลอมเกิดขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อหรือไม่ ถ้ามีแสดงว่าเกิดการปนเปื้อน จึงไม่ควรใช้เชื้อที่เจริญบนจานอาหารดังกล่าว

5.2 เมื่อได้จานอาหารที่ไม่เกิดการปนเปื้อนเชื้ออื่นแล้ว ให้สุ่มเลือกโคโลนีที่เจริญอยู่เดี่ยวๆ โดยใช้ลูปหรือเข็มเขี่ยเชื้อ เขี่ยลงมาเลี้ยงบนวุ้นเอียงในหลอดอีกครั้ง

5.3 หลังจากที่เชื้อเจริญบนอาหารวุ้นแล้ว ให้นำไปทดสอบประสิทธิภาพในการหมักสูงสุด จากนั้นจึงเลือกเชื้อตามที่ต้องการนำไปขยายเชื้อเพิ่มต่อไป

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยเครื่องอีบูลิโอมิเตอร์ [19]

หลักการวิเคราะห์ คือวัดปริมาณแอลกอฮอล์จากค่าการเปลี่ยนแปลงจุดเดือดของสารละลายตัวอย่าง แล้วนำมาอ่านค่าบนสเกล ซึ่งจะได้ค่าปริมาณแอลกอฮอล์ในหน่วยเปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยมีข้อจำกัดว่าปริมาณแอลกอฮอล์ในสารละลายต้องไม่เกิน 16 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

1. การหาจุดเดือดของน้ำ

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในหม้อต้ม (Boiling chamber) เสียบเทอร์โมมิเตอร์ ต่อรีฟลักซ์คอนเดนเซอร์ (Reflux condenser) จุดตะเกียงจากนั้นต้มน้ำจนกระทั่งน้ำเดือด โดยสังเกตจากไอน้ำที่ขึ้นมาเกาะบนคอนเดนเซอร์ อ่านค่าอุณหภูมิของน้ำเดือด (จุดที่ปรอทขึ้นไปแล้วคงที่) บันทึกเป็นอุณหภูมิของน้ำเดือด

2. การหาค่าจุดเดือดของสารละลายตัวอย่าง

รินสารละลายตัวอย่างปริมาณ 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในหม้อต้ม เสียบเทอร์โมมิเตอร์ต้มเช่นเดียวกันกับน้ำกลั่น อ่านค่าอุณหภูมิจุดเดือดของสารละลาย บันทึกค่าที่อ่านได้

3. การอ่านค่าปริมาณแอลกอฮอล์

นำค่าอุณหภูมิจุดเดือดมาตั้งให้ตรงกับตำแหน่ง 0 ของสเกล ซึ่งหมายถึง 0 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ แล้วดูตัวเลขที่ตรงกับค่าอุณหภูมิจุดเดือดของสารละลาย จะได้ค่าปริมาณแอลกอฮอล์ในสาระลาย เช่น อุณหภูมิจุดเดือดอ่านค่าได้ 100 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิจุดเดือดของสารละลายอ่านค่าได้ 90.6 องศาเซลเซียส นำไปอ่านค่าบนสเกล โดยตั้งให้ 100 ตรงกับเลข 0 จะสามารถอ่านค่าปริมาณแอลกอฮอล์ได้เท่ากับ 13.5 เปอร์เซ็นต์บันทึกค่าที่อ่านได้

ภาคผนวก ง

การคำนวณปริมาณแอลกอฮอล์จากร้อยละโดยปริมาตร (% v/v) เป็นร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร

สมมติปริมาณแอลกอฮอล์ที่วัดได้ X % (โดยปริมาตร) นั่นคือสารตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร มีปริมาณแอลกอฮอล์ = X มิลลิลิตร

ถ้าสารตัวอย่าง 1000 มิลลิลิตร มีปริมาณแอลกอฮอล์ $= \frac{X \times 1000}{100}$

$= X \times 10$ มิลลิลิตรต่อลิตร

จากความหนาแน่นของเอทานอล $= 0.79$ กรัมต่อมิลลิลิตร

เพราะฉะนั้นปริมาณแอลกอฮอล์ $= X \times 10$ มิลลิลิตรต่อลิตร $\times 0.79$ กรัมต่อมิลลิลิตร

$= X \times 10 \times 0.79$ กรัมต่อลิตร

ภาคผนวก จ
วิธีการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง [20]

การหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีความสำคัญมากต่อการหาพารามิเตอร์อื่นๆ เช่น ผลได้ (Yield) และอัตราการผลิต (Productivity)

1. การหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำโดยการเตรียมหลอดทดลองอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการหาน้ำหนักที่แน่นอนของหลอดทดลอง

2. ดูดสารตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองจำนวน 3 หลอดต่อ 1 ตัวอย่าง

3. นำหลอดที่ใส่สารตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงที่ 1,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นรินส่วนที่ลอยทิ้ง

4. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองนำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง ทำซ้ำ 2 ครั้งรินส่วนที่ลอยทิ้ง นำหลอดทดลองที่มีเซลล์ยีสต์ ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน บันทึกน้ำหนักที่ได้

6. คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (C_X) กรัม/ลิตร

$$C_X = \frac{\text{น้ำหนักหลอดทดลองและเซลล์แห้ง (กรัม) - น้ำหนักหลอดทดลอง (กรัม)}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)} \times 10^{-3}}$$

ภาคผนวก ฉ

การคำนวณค่าประสิทธิภาพผลได้ (Yield efficiency)

$$\text{ค่าประสิทธิภาพผลได้ (\%)} = \frac{\text{ผลได้เอทานอล}}{\text{ผลได้เอทานอลทางทฤษฎี (0.51)}} \times 100$$

ตัวอย่างการคำนวณ

จากการหมักเอทานอลแบบกะโดยใช้น้ำหวานที่หีบได้จากต้นข้าวฟ่างหวานที่มีน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 18 องศาบริกซ์ มีการดึงน้ำหมักจากตัวอย่างชั่วโมงที่ 0 เมื่อนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นเอทานอลได้ 4.30 กรัมต่อลิตร เมื่อการหมักดำเนินไปถึงชั่วโมงที่ 33 ทำการดึงน้ำหมักและวัดความเข้มข้นเอทานอลได้ 58.79 กรัมต่อลิตร ดังนั้นได้ปริมาณเอทานอลที่ผลิตขึ้น 58.79-4.30 เท่ากับ 54.49 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทั้งหมดที่ใช้คือ 172.92-46.55 เท่ากับ 126.37 กรัมต่อลิตร ผลได้เอทานอลต่อกรัมน้ำตาลเท่ากับ 54.49/126.37 เท่ากับ 0.43 ผลได้ทางทฤษฎีเท่ากับ 0.51 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล เพราะฉะนั้น ร้อยละประสิทธิภาพผลได้ คำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{ร้อยละประสิทธิภาพผลได้} = \frac{0.43}{0.51} \times 100$$

$$= 84.55$$

ภาคผนวก ช

แสดงการคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ

ตาราง ผช-1 ตัวอย่างผลการทดลองการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Saccharomyces crervisiae* แบบกะ

เวลา (ชั่วโมง)	OD_{600}	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	จำนวนเซลล์ทั้งหมด (เซลล์/ลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	DO (%)
0	0.08	0.22	7.0×10^{9}	20.8	0.3	50
1.5	0.27	0.34	9.7×10^{9}	15.4	0.2	-
3.5	0.69	0.51	21.5×10^{9}	15.0	0.3	45
6.25	1.85	1.07	6.42×10^{10}	11.6	1.2	40
8.20	3.78	2.12	11.3×10^{10}	5.4	3.45	40
10.5	7.04	3.65	22.6×10^{10}	0	6.3	50
12.0	8.60	4.40	31.2×10^{10}	0	5.8	50
22.0	9.10	4.50	36.0×10^{10}	0	4.2	-
23.5	9.55	4.63	36.6×10^{10}	0	3.9	65

1. ผลได้ของเซลล์ ($Y_{X/S}$)

จากผลการทดลองข้างต้นจะได้

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{4.63-0.22}{20.8} = 0.21$$ กรัมเซลล์ต่อกรัมกลูโคส

2. ผลได้ของผลิตภัณฑ์ ($Y_{P/S}$)

จากผลการทดลองข้างต้นจะได้

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{6.3-0.3}{20.8} = 0.29$$ กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคส

3. อัตราการผลิตเซลล์ (Q_X)

ตัวอย่างจากผลการทดลองในตาราง จะได้ว่า ในเวลา 23.5 ชั่วโมงจะมีผลผลิตของเซลล์เท่ากับ 4.63 – 0.22 = 4.41 กรัมต่อลิตร

อัตราการผลิตเซลล์ = 0.19 กรัมเซลล์ต่อลิตร ชั่วโมง

4. อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ (Q_P)

ตัวอย่างจากผลการทดลองในตาราง จะได้ว่า ในเวลา 10.5 ชั่วโมงจะมีผลผลิตของเซลล์เท่ากับ 6.3 – 0.3 = 6.0 กรัมต่อลิตร

อัตราการผลิตเอทานอล = 0.57 กรัมเซลล์ต่อลิตร.ชั่วโมง

ภาคผนวก ซ
การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส [13]

อุปกรณ์

1. บีกเกอร์ขนาด 250 และ 1000 มิลลิลิตร
2. กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร
3. ขวดรูชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
4. ขวดรับบริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร
5. แท่งแก้วคน
6. กรวยกรอง
7. กระจกนาฬิกา
8. เครื่องกวนสาร
9. กระดาษกรองเบอร์ 1

วิธีการเตรียมสาร

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ และ 17.5 เปอร์เซ็นต์

วิธีเตรียม : นำสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักปริมาตร 290 มิลลิลิตร เทลงในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตความเข้มข้น 0.50 และ 0.10 นอร์มัล

วิธีเตรียม : ละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 24 .52 และ 4.909 กรัม ในน้ำกลั่นตามลำดับ ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยขวดปรับปริมาตร

3. สารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.10 นอร์มัล

วิธีเตรียม : ละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต 40.5 กรัมในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ทำการาความเข้มข้นที่แน่นอนทุกครั้งที่ใช้ โดยนำไปไตเตรทกับสารละลายโพแทสเซียมไดโคเมตมาตรฐาน

วิธีหาความเข้มข้นที่แน่นอน : ปิเปตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตเข้มข้น 0.10 นอร์มัล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 90 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในขวด โดยเอียงขวดทำมุม 45 องศากับพื้น ตั้งพักไว้ให้เย็น หยดอินดิเคเตอร์ที่เตรียมไว้ 2-4 หยด นำไปไตเตรทกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ต้องการหาความเข้มข้นที่แน่นอน

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

โดยที่ N_1 คือ ความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (นอร์มัล)

N_2 คือ ความเข้มข้นของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (นอร์มัล)

V_1 คือ ปริมาตรของสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (มิลลิลิตร)

V_2 คือ ปริมาตรของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (มิลลิลิตร)

4. สารละลายอินดิเคเตอร์

วิธีเตรียม : ละลาย 1,10-ฟีนานโธรลีนโมโนไฮเดรต ($C_{12}H_5N_2 \cdot H_2O$) หนัก 1.5 กรัม กับเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot H_2O$) 0.7 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ในการไตเตรท

5. สารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 3 นอร์มัล

วิธีเตรียม : ค่อยๆ เทกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 98 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 83.5 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส

1. ชั่งกากมันสำปะหลังที่บดละเอียดหนัก 1.5 กรัมน้ำหนักแห้ง ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร บันทึกน้ำหนักกากมันสำปะหลังไว้ เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปิดบีกเกอร์ด้วยกระจกน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลังครบเวลาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

2. กรองสารละลายเพื่อแยกตะกอนกากมันสำปะหลังออก โดยทิ้งสารละลายใสปริมาตร 10 มิลลิลิตรแรกของการกรอง เก็บสารละลายใสเพื่อนำวิเคราะห์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3. การวิเคราะห์ปริมาตรแอลฟา-เซลลูโลส (เซลลูโลส)

3.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2. ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตความเข้มข้น 0.5 นอร์มัล ลงไปปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.2 ค่อยๆ เทกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 30 มิลลิลิตรลงไปโดยเอียงขวดทำมุม 45 องศากับพื้นโต๊ะ เพื่อป้องกันการเดือดอย่างรุนแรงของสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

3.3 หยดอินดิเคเตอร์ 2-4 หยด นำไปไตเตรทกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองอมส้มเป็นสีน้ำตาลอมม่วง บันทึกปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้

3.4 เตรียมสารละลายแบลงค์ โดยปิเปตสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำวิธีการเดียวกับสารละลายตัวอย่างในข้อ 3.1 ถึง 3.3

$$\text{แอลฟา-เซลลูโลส (\%)} = 100 - [6.85\,(V4-V_3) \times N \times 20 / (A \times W)]$$

V_3 คือ ปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

V_4 คือ ปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลายแบลงค์ (มิลลิลิตร)

N คือ ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (นอร์มัล)

A คือ ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

W คือ น้ำหนักกากมันสำปะหลังแห้ง (กรัม)

ค่าคงที่ 6.85 คือ มิลลิกรัมสมมูลของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับเซลลูโลส

การวิเคราะห์ปริมาณแกมม่า-เซลลูโลส

4.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2. ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในกระบอกตวงที่มีจุกปิด เติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 3 นอร์มัล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไความร้อนที่อุณหภูมิ 70 ถึง 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ถึง 3 นาที เพื่อให้เกิดการตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ กรองสารละลายโดยเก็บสารละลายส่วนใสวิเคราะห์

4.2 นำสารละลายที่กรองได้วิเคราะห์วิธีการเดียวกับข้อ 3.1 ถึง 3.3

แกมม่า-เซลลูโลส = $[6.85\ (V_4\text{-}V_3)\times N\times 20/(A\times W)]$

V_3 คือ ปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

V_4 คือ ปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลายแบลงค์ (มิลลิลิตร)

N คือ ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (นอร์มัล)

A คือ ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

W คือ น้ำหนักกากมันสำปะหลังแห้ง (กรัม)

การวิเคราะห์ปริมาณเบต้า-เซลลูโลส (เฮมิเซลลูโลส)

เบต้า-เซลลูโลส = 100- (แอลฟา- เซลลูโลส + แกมม่า-เซลลูโลส)

ภาคผนวก ฌ

การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า [14]

เถ้า คือ แร่ธาตุต่างๆ ในอาหาร เมื่อนำอาหารมาเผา (ignite) น้ำในอาหารจะระเหยไปจนหมด สารอินทรีย์จะถูก oxidize เหลือสารอนินทรีย์ซึ่งได้แก่พวกแร่ธาตุต่างๆ Drying Ashing ใช้เตาเผา ที่อุณหภูมิ 500-600 เซลเซียส การเผาในระยะแรก น้ำและสารที่ระเหยได้ไปในระหว่างการเผาต่อไปจะได้เถ้าสีดำ เพราะเกิด oxidation ของสารอินทรีย์เมื่อการเผาสมบูรณ์จะได้เถ้าสีขาว คือ Total ash จากนั้นนำ Total ash ไปวิเคราะห์หาชนิดของแร่ธาตุต่างๆ ด้วยวิธีการที่เหมาะสม เช่น Titration และ Spectrophotometer

อุปกรณ์

1. ถ้วยครูซิเบิ้ล
2. เตาเผา ที่ 500-600 องศาเซลเซียส
3. เดสิกเคเตอร์
4 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

วิธีการวิเคราะห์

1. อบถ้วยครูซิเบิ้ล 130 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างอาหาร 4-6 กรัม (น้ำหนักที่แน่นอน)
3. นำไปเผาในเตาเผา ที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมงจนได้เถ้าสีขาว
4. เมื่อนำตัวอย่างออกจากเตาเผา ให้คลายความร้อนที่อุณหภูมิห้องสักครู่ก่อนนำเข้าสู่โถดูดความชื้น
5. ชั่งน้ำหนักและคำนวณหา % Total ash

$$\%TotalAsh = \frac{W_{ash}}{W_{sample}} \times 100$$

น้ำหนักเถ้า = (น้ำหนักภาชนะ+ เถ้า) – น้ำหนักภาชนะ

ภาคผนวก ญ
การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น [15]

ตัวอย่างจะถูกทำให้ระเหยในภาชนะที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว และนำไปอบจนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นจากน้ำหนักภาชนะเปล่าถือเป็นตัวแทนของปริมาณของแข็งทั้งหมด ซึ่งค่าความชื้นจะคิดจากการนำค่าปริมาณของแข็งหักออกจากค่า 100

อุปกรณ์

1. ถ้วยอลูมิเนียม
2. ตู้อบไฟฟ้า
3. เดสิเคเตอร์
4. คีมคีบ และ/หรือ ถุงมือพลาสติก
5. ช้อนตักสาร
6. เครื่องชั่งละเอียด

วิธีวิเคราะห์

1. นำถ้วยอลูมิเนียมไปอบที่ 105-107 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำออกมาใส่ในเดสิกเคเตอร์ ให้เย็นชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งละเอียด (A)
2. ชั่งตัวอย่างในถ้วยให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 5 กรัม บันทึกน้ำหนักตัวอย่าง (B)
3. นำไปอบที่ตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105-107 องศาเซลเซียส นานประมาณ 5 ชั่วโมง จากนั้นนำออกไปชั่งใส่เดสิกเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปชั่ง จดน้ำหนัก
4. อบซ้ำนานครั้งละ 30 นาทีจนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 2 มิลลิกรัม จดน้ำหนักที่น้อยที่สุดถือเป็นน้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนี่ยมและตัวอย่างหลังจากอบแห้งแล้ว

วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น(ร้อยละของน้ำหนัก)} = \frac{100 \times (A + B) - C}{B}$$

เมื่อ A คือ น้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนียม (กรัม)

B คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

C คือ น้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนียมและน้ำหนักตัวอย่างหลังจากที่อบแห้งแล้ว (กรัม)

ภาคผนวก ฎ

การวิเคราะห์หาปริมาณธาตุไนโตรเจนโดยวิธีเจดาลห์ (Kjedahl Method) [16]

อุปกรณ์

1. kjedahl digestion flask 50 or 100 มล.
2. digestion apparatus
3. distillation apparatus
4. บิวเรต (micro – burette),capacity 5 or 10 มล.
5. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) 125 มล.
6. บีกเกอร์ (beaker) 600 มล.2,000 มล.

สารเคมี

1. sulfuric acid (H_2SO_4) concentrate (commercial grade)
2. sodium hydroxide (NaOH) 40%
3. indicator solution
4. Boric acid – indicator solution (2% H_3BO_3)
5. Sodium hydroxide (NaOH)
6. HCl 0.1 N
7. Potassium sulfate – catalyst mixture
8. Sulfuric acid 0.005 N Hydrochloric acid 0.005 N

การเตรียมสารเคมี

1. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 40 เปอร์เซ็นตร์

ชั่ง NaOH 400 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ 2000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปให้ถึงขีด 1000 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งแก้วให้ NaOH ละลายหมด รินใส่ขวดปิดจุกให้แน่น

3. สารละลายอินดิเคเตอร์

ละลาย methyl red 0.066 กรัมและ bromcresol green 0.099 กรัม ในเอทานอล 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดมีจุกปิดสนิท

4. Boric acid - indicator solution (2% H_3BO_3)

4.1 ชั่ง boric acid (H_3BO_3) 20 กรัม ใส่ใน beaker ขนาด 600 มล.

4.2 เติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 200 มล. นำไปอุ่นเพื่อให้ boric acid ละลายหมด (ในขณะอุ่นคนด้วยแท่งแก้ว) รินใส่ volumetric flask ขนาด 1000 มล.

4.3 เติมน้ำกลั่นลงไปอีกประมาณ 600 มล. (โดยการใช้น้ำกลั่นชะล้าง beaker ที่ใส่ H_3BO_3 ทีละน้อย) ตั้งสารละลายไว้ให้เย็น

4.4 เติม mixed indicator ลงไป 20 มล. เขย่าให้เข้ากัน ปรับสีของสารละลายนี้ด้วย NaOH 0.1 N และ HCl 0.1 N โดยการหยดลงไปทีละน้อยจนสารละลายเป็นสีม่วงแดง (pH ของสารละลายประมาณ 5.0)

4.5 ตรวจสอบสีของสารละลายนี้ว่าใช้ได้หรือไม่ โดยนำเอาสารละลาย boric acid indicator ประมาณ 10 มล. ค่อยๆ เติมน้ำกลั่นลงไปทีละน้อยสีของสารละลายจากสีม่วงแดงเปลี่ยนเป็นสีเขียวทันที เมื่อปริมาตรของสารละลายกับน้ำกลั่นเท่ากัน ถ้าสีของสารละลายไม่เปลี่ยนหรือเปลี่ยนเร็วเกินไปก็ปรับด้วย NaOH 0.1 N และ HCl 0.1 N แล้วตรวจสอบจนกว่าจะได้ตามต้องการ แล้วปรับให้มีปริมาตร 1 ลิตร

5. Sodium hydroxide (NaOH)

ละลาย NaOH 2.0 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 200 มล. แล้วปรับให้เป็น 1 ลิตร (Standardized หาความเข้มข้นที่แท้จริงโดยใช้ Potassium hydrogen pathalate)

6. HCl 0.1 N

7. Potassium sulfate - catalyst mixture

Salicylic acid 10 กรัม K_2SO_4 100 กรัม $CuSO_4.5H_2O$ 1.0 กรัม บดให้เข้ากัน

8. Sulfuric acid 0.005 N Hydrochloric acid 0.005 N

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วจำนวน 2 กรัม ใส่ใน Kjeldahl digestion flask

2. ใส่ Potassium sulfate - catalyst mixture 1.1 กรัม

3. เติม conc. H_2SO_4 (commercial grade) 5 มล. เขย่าให้เข้ากัน

4. นำเข้าเตาย่อยโดยใช้อุณหภูมิต่ำ ประมาณ 1 ชม. จึงเพิ่มอุณหภูมิให้สูงจนกว่าตัวอย่างจะใช้ได้ (clear) ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 2-3 ชม. ตัวอย่างจะเป็นสีเขียวใส และไม่มีควันของกรดซัลฟูริคปนอยู่

5. เมื่อตัวอย่างใช้ได้แล้วนำออกจากเตาย่อยทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 10 มล. (อย่าเติมน้ำกลั่นในขณะที่ flask ยังร้อนอยู่) เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปปรับปริมาตร100 มล.ในขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ใช้น้ำกลั่นล้าง digestion flask ประมาณ 3 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีตัวอย่างเหลืออยู่ใน digestion flask

6. ดูดสารละลายที่ได้ด้วย ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) 5 หรือ 10 มล. ใส่ distillation flask นำไปกลั่นหาปริมาณไนโตรเจนโดยวิธีการต่อไปนี้

7. นำ ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) 125 มล. ซึ่งมี boric acid - indicator บรรจุอยู่ 5 มล. มารองรับใต้ condenser ของเครื่องกลั่น พยายามให้ปลายของ condenser จุ่มอยู่ใน boric acid

8. นำตัวอย่างที่ใส่ใน distillation flask แล้วเติมใส่ 10 N NaOH ประมาณ 10 มล.

9. ทำการกลั่นจนกว่าปริมาตรของสารใน ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) เพิ่มถึงขีด 50 มล.

10. นำสารละลายที่ได้มาไทเทรตกับ standard 0.005 N H_2SO_4 จดปริมาตรของ standard H_2SO_4 ที่ใช้ เพื่อนำมาคำนวณหาปริมาตร total nitrogen ในตัวอย่าง

การหาปริมาณโปรตีน

การคำนวณหาปริมาณโปรตีนนั้นหาจากปริมาณไนโตรเจนที่ได้ โดยปกติแล้วในตัวอย่างทั่วๆ ไปจะมีปริมาณไนโตรเจนอยู่ 16% คิดเป็นแฟกเตอร์ของไนโตรเจนในโปรตีน เท่ากับ 6.25 (100 / 16)

เปอร์เซ็นต์โปรตีน = 6.25 x เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน

การคำนวณ

การหาเปอร์เซ็นต์ ไนโตรเจน ทำได้โดยการใช้สูตรดังนี้

เปอร์เซ็นต์ Nitrogen = 14.01 x (ปริมาตรของกรดที่ไตเตรตกับตัวอย่าง
– ปริมาตรกรดที่ไตรเตรตกับ Blank*)(ความเข้มข้นเป็นNormal
ของกรด) x 100 / น้ำหนักตัวอย่าง x 1000

Blank คือ ของเหลวที่ได้จากการใส่สารทุกชนิดในขบวนการ Kjeldahl ยกเว้น Sample

ภาคผนวก ฏ
การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ [18]

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใช้วิเคราะห์ด้วยสารละลายกรดไนโตรซาลิไซลิกซึ่งสามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 0.4 กรัมต่อลิตรของสารละลาย

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 570 นาโมเมตร
2. คิวเวต (cuvette)
3. อ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส
4. ขวดปรับปริมาตร 250 และ 1000 มิลลิลิตร
5. ปิเปตขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร
6. หลอดทดลองขนาดกลางที่มีฝาปิด
7. ขวดสีชา
8. เครื่องชั่งระเอียด 2 ตำแหน่ง

สารเคมีและวิธีการเตรียม

1. สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-dinitrosalicylic acid:$C_7H_4N_2O_7$)

วิธีเตรียม:ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1.00 กรัมกับโซเดียมโพแทสเซียมตาร์เตรท 300 กรัมในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นเก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ 1 ถึง 2 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้

2. โซเดียมโพแทสเซียมตาร์เตรท (sodium potassium tartate:$KNaC_4H_4O_6 . 4H_2O$)
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์

วิธีเตรียม:ละลายเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร

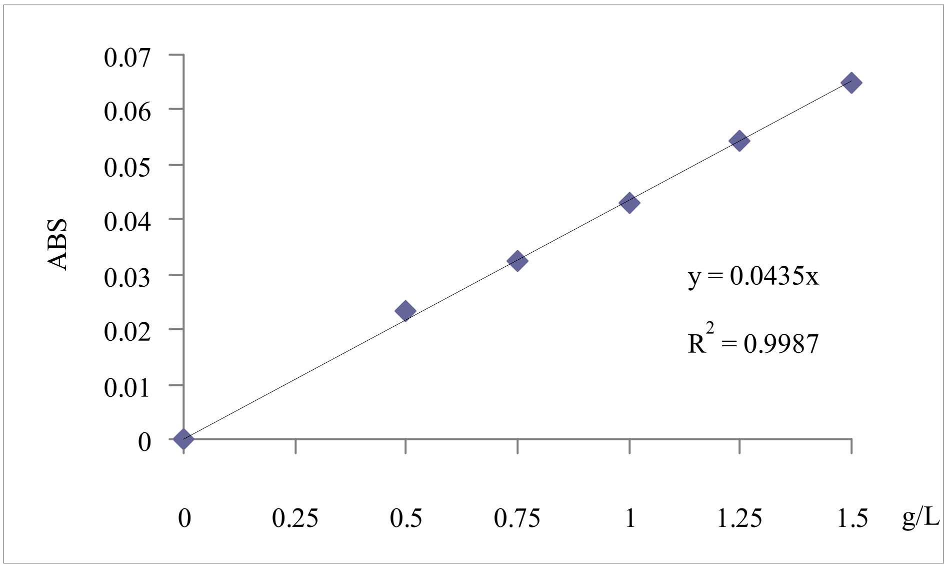
4. สารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 0.4 กรัมต่อลิตร

วิธีเตรียม:ละลายน้ำตาลกลูโคสหนัก 10 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้เป็นสารละลายเริ่มต้น (stock solution) เจือจางที่ความเข้มข้นในช่วงที่ต้องการ

5. นำสารละลายเริ่มต้นที่เจือจางในข้อ 4. ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง ปิเปตสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิกปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ปิดฝาหลอดผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นลงทันที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลื่นแสงโดยเทียบค่ากับสารละลายแบลงค์

ตารางที่ผฎ-1 ค่าความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลกลูโคสและการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร
0.00	0.000
0.50	0.0.24
0.75	0.033
1..00	0.043
1.25	0.055
1.50	0.065



รูปที่ผฎ-1 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดกลาง ปิเปตสารละลายกรดไดไนโตรสาลิไซลิกปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในหลอด ปิดฝาหลอด ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นลงทันที

2. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสงโดยเทียบค่ากับสารละลายแบลงค์ (สารละลายแบลงค์เตรียมโดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายเช่นเดียวกับสารละลายตัวอย่าง) นำไปอ่านค่าความเข้มข้นของน้ำตาลบนกราฟของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (standard curve)

ภาคผนวก ฐ
การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล [22]

การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ใช้วิธีวิเคราะห์โดย Flash Distillation ซึ่งสามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในช่วงความเข้มข้น 2 ถึง 10 กรัมต่อลิตรของสารละลาย

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้น 600 นาโนเมตร
2. คิวเวต (cuvette)
3. อ่างควบคุมอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส
4. ขวดปรับปริมาตร 250 และ 1000 มิลลิลิตร
5. ปิเปตขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร
6. หลอดทดลองขนาดกลางที่มีฝาปิด
7. ขวดสีชา
8. เครื่องชั่งระเอียด 2 ตำแหน่ง

สารเคมีและวิธีเตรียม

1. สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในกรดซัลฟิวริก 0.5 โมลาร์
   วิธีเตรียม:ละลายโพแทสเซียมไดโครเมตหนัก 29.4 กรัม ในสารละลายกรดซัลฟิวริก 98% ปริมาตร 25.6 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น
2. แอลกอฮอล์บริสุทธิ์
3. สารละลายแอลกอฮอล์มาตรฐานค่าความเข้มข้นในช่วง 2 ถึง 10 กรัมต่อลิตร

วิธีเตรียม: จือจางแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นในช่วง 0 ถึง 10 กรัมต่อลิตร

การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์

1. ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์โดยประมาณให้มีในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 10 กรัมต่อลิตร

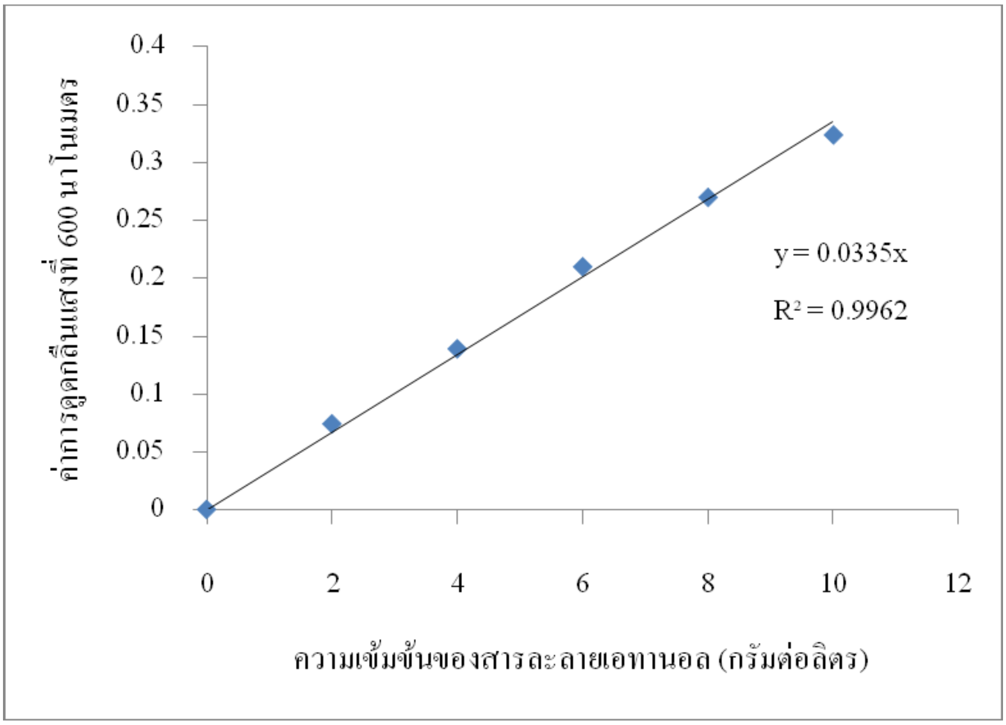
2. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้วจากข้อที่ 1. ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในกรดซัลฟิวริก 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในหลอดฝาเกลียวปิดสนิท

3. เติมน้ำกลั่นลงไป 2 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบระยะเวลานำไปแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 2 นาที ทันที

4. นำสารละลายจากข้อ 3. ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสงโดยเทรียออลบกับสารละลายแบลงค์ นำไปอ่านค่าความเข้มข้นของแอลกอฮอล์บนกราฟของสารละลายแอลกอฮอล์มาตรฐาน

ตารางที่ผฐ-1 ค่าความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600นาโนเมตร
0	0.000
2	0.074
4	0.139
6	0.210
8	0.270
10	0.324



รูปที่ ผฐ-1 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

ภาคผนวก ฑ
การวิเคราะห์ปริมาณลิกนิน [17]

อุปกรณ์

1. กระบอกตวงขนาด 50 ml และขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml
2. เดสิเคเตอร์และกระจกนาฬิกา
3. เครื่องกวนสารและแท่งแม่เหล็ก
4. กระดาษกรองเบอร์ 1
5. ขวดก้นกลม เตาไฟฟ้าพร้อมคอนเด็นเซอร์สำหรับรีฟรักซ์

วิธีวิเคราะห์

1. ใช้ตาชั่ง 4 ตำแหน่ง ชั่งลำต้นข้าวฟ่างหวาน 1.0 กรัมน้ำหนักแห้งใส่ลงบีกเกอร์โดยบันทึกน้ำหนักที่แน่นอนไว้ เติมกรด ซัลฟิวริก 72 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 10 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระจกนาฬิกา นำไปกวนบนเครื่องกวนสารที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
2. เทสารละลายจากข้อ 1. ลงในขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจำนวน 385 มิลลิลิตร
3. นำสารละลายไป Reflux เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดตะกอนอย่างสมบูรณ์ (ทิ้งไว้ค้างคืน)
4. อบแห้งกระดาษกรอง 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงนำไปใส่ในโถดูดความชื้น โดยทำการทำเครื่องหมายไว้ที่กระดาษกรอง ชั่ง น้ำหนักกระดาษกรองและบันทึกผล
5. กรองตะกอน (โดยใช้กระดาษกรองจากข้อ 4) โดยใช้น้ำกลั่นเจือจางสารตัวอย่าง มิฉะนั้นกระดาษอาจขาดหรือทะลุ และทำการอบแห้งตะกอนที่ได้บนกระดาษกรองที่ อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (การกรองต้องระวังไม่ให้กระดาษกรองขาด) ชั่งน้ำหนักบันทึกผล
6. การคำนวณ

ปริมาณลิกนิน (%) = (น้ำหนักตะกอนแห้ง/น้ำหนักลำต้นข้าวฟ่างหวานแห้ง) × 100

ภาคผนวก ฒ

ข้อมูลดิบของการหาสภาวะที่เหมาะสมตามวิธีการทดลองออร์โธโกนอล

ตารางที่ผฒ-1 ปัจจัยควบคุมแต่ละระดับกับความเข้มข้นของเซลล์และเอทานอลที่เกิดจากการหมักเอทานอลจากต้นสดข้าวฟ่างหวานพันธุ์เคลเลอร์

ลำดับที่	น้ำหนักต้นสด (กรัม)	ครูดเซลลูเลสผง (กรัม)	ระยะเวลา (วัน)	จุลินทรีย์ x10^7 (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
1	10	1	1	5
2	15	5	1	15
3	20	4	1	14
4	25	3	1	12
5	30	2	1	9
6	10	2	3	15
7	15	1	3	5
8	20	5	3	19
9	25	4	3	25
10	30	3	3	12
11	10	3	5	16
12	15	2	5	13
13	20	1	5	6
14	25	5	5	28
15	30	4	5	31
16	10	4	7	26
17	15	3	7	16
18	20	2	7	11
19	25	1	7	25
20	30	5	7	22
21	10	5	9	31
22	15	4	9	32
23	20	3	9	15
24	25	2	9	12
25	30	1	9	21

ตารางที่ผฒ-2 ปัจจัยควบคุมแต่ละระดับกับความเข้มข้นของเซลล์ที่เกิดจากการหมักเอทานอลจากต้นสดข้าวฟ่างหวานพันธุ์คาวเลย์

ลำดับที่	น้ำหนักต้นสด (กรัม)	ครูดเซลลูเลสผง (กรัม)	ระยะเวลา (วัน)	จุลินทรีย์ x10^7 (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
1	10	1	1	5
2	15	5	1	14
3	20	4	1	15
4	25	3	1	12
5	30	2	1	10
6	10	2	2	13
7	15	1	2	8
8	20	5	2	21
9	25	4	2	21
10	30	3	2	19
11	10	3	3	15
12	15	2	3	15
13	20	1	3	12
14	25	5	3	30
15	30	4	3	22
16	10	4	4	24
17	15	3	4	18
18	20	2	4	15
19	25	1	4	17
20	30	5	4	35
21	10	5	5	27
22	15	4	5	32
23	20	3	5	24
24	25	2	5	12
25	30	1	5	25

ตารางที่ผฒ-3 สัญลักษณ์ของปริมาณต่างๆ ของปัจจัยควบคุมและระดับปัจจัย ที่ใช้ในวิธีการทดลองออร์โธโกนอล

ระดับ	ปัจจัยควบคุม		
	น้ำหนักต้นสด (กรัม)	ครูดเซลลูเลสผง (กรัม)	ระยะเวลา (วัน)
M1	10	1	1
M2	15	2	3
M3	20	3	5
M4	25	4	7
M5	30	5	9

ตารางที่ผฒ-4 สภาวะที่เหมาะสมจากการคำนวณตามวิธีการทดลองออร์โธโกนอลของการหมักเอทานอลจากต้นสดข้าวฟ่างหวานพันธุ์เคลเลอร์

ระดับ	ปัจจัยควบคุม		
	น้ำหนักต้นสด (กรัม)	ครูดเซลลูเลสผง (กรัม)	ระยะเวลา (วัน)
M1	18	12	11
M2	16	12	15
M3	13	14	19
M4	20	25	20
M5	19	23	22
Rj	7	13	11
สภาวะที่เหมาะสม	25	4	9

ตารางที่ผฒ-5 สภาวะที่เหมาะสมจากการคำนวณตามวิธีการทดลองออร์โธโกนอลของการหมักเอทานอลจากต้นสดข้าวฟ่างหวานพันธุ์คาวเลย์

ระดับ	ปัจจัยควบคุม		
	น้ำหนักต้นสด (กรัม)	ครูดเซลลูเลสผง (กรัม)	ระยะเวลา (วัน)
M1	17	13	11
M2	17	13	16
M3	18	17	19
M4	18	23	22
M5	22	25	24
Rj	5	12	13
สภาวะที่เหมาะสม	30	5	9