

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางผนวกที่ ก1 แสดงผลของน้ำตาลไซโลสบริสุทธิ์โดยการหมักด้วยเชื้อยีสต์ *C. magnolia* TISTR 5664 ที่มีผลต่อการเจริญและผลิตไซลิทอล

เวลา (ชั่วโมง)	ไซโลสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ไซโลสที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอลที่เกิด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	26.49	0.00	0.00	0.51
12	21.03	5.46	0.69	0.81
24	15.59	10.90	3.02	3.20
48	0.17	26.32	7.54	12.42
72	0.00	26.49	6.83	12.70

ตารางผนวกที่ ก2 แสดงผลของน้ำเลี้ยงไซโลสโดยการหมักด้วยเชื้อยีสต์ *C. magnolia* TISTR 5664 ที่มีผลต่อการเจริญและผลิตไซลิทอล

เวลา (ชั่วโมง)	ไซโลส ที่เหลือ (กรัมต่อ ลิตร)	ไซโลส ที่ถูกใช้ (กรัมต่อ ลิตร)	กลูโคส ที่เหลือ (กรัมต่อ ลิตร)	กลูโคส ที่ถูกใช้ (กรัมต่อ ลิตร)	ไซลิทอล ที่เกิด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	24.35	0.00	13.69	0.00	0.00	0.51
12	18.22	6.13	4.43	9.26	0.33	5.17
24	7.62	16.73	2.73	10.96	0.95	10.38
48	2.32	22.03	0.09	13.60	1.66	20.81
72	0.53	23.82	0.00	13.69	1.06	17.38

ตารางผนวกที่ ก3 แสดงผลของน้ำตาลไซโลสบริสุทธิ์โดยการหมักด้วยเชื้อยีสต์ *C. guilliermondii* FTI 20037 ที่มีผลต่อการเจริญและผลิตไซลิทอล

เวลา (ชั่วโมง)	ไซโลสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ไซโลสที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอลที่เกิด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	27.48	0.00	0.00	0.51
12	19.10	8.38	2.23	1.83
24	5.29	22.19	6.60	2.71
48	0.00	27.48	6.27	13.96
72	0.00	27.48	6.21	11.52

ตารางผนวกที่ ก4 แสดงผลของน้ำตาลไซโลสโดยการหมักด้วยเชื้อยีสต์ *C. guilliermondii* FTI 20037 ที่มีผลต่อการเจริญและผลิตไซลิทอล

เวลา (ชั่วโมง)	ไซโลส ที่เหลือ (กรัมต่อ ลิตร)	ไซโลส ที่ถูกใช้ (กรัมต่อ ลิตร)	กลูโคส ที่เหลือ (กรัมต่อ ลิตร)	กลูโคส ที่ถูกใช้ (กรัมต่อ ลิตร)	ไซลิทอล ที่เกิด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	26.10	0.00	13.87	0.00	0.00	0.51
12	15.60	10.50	4.30	9.57	1.13	10.68
24	5.33	20.77	1.36	12.51	2.17	15.23
48	1.16	24.94	0.00	13.87	2.98	25.40
72	0.54	25.56	0.00	13.87	2.04	22.32

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ผลทางเคมี

1. การหาปริมาณความชื้นในตัวอย่างไม้

1.1 ทำความสะอาด Platinum crucible แล้วอบแห้ง ชั่งน้ำหนักให้ทราบแน่นอน

1.2 ชั่งผงตัวอย่างไม้ขนาดที่ผ่าน 40 เมช แต่ไม่ผ่าน 60 เมช ใส่ใน Platinum crucible ตัวอย่างละ 2 ± 0.1 กรัม แล้วนำเข้าเตาอบที่อุณหภูมิ 100 ± 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

1.3 นำออกจากเตาอบใส่โถดูดความชื้น ทิ้งให้ Platinum crucible แล้วชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำ เช่นนี้จนตัวอย่างมีน้ำหนักคงที่

1.4 คำนวณปริมาณความชื้นจาก

$$\% \text{ ปริมาณความชื้น} = 100 (W1 - W2) / W1$$

โดยที่ W1 คือ น้ำหนักผงตัวอย่างสด
W2 คือ น้ำหนักผงตัวอย่างอบแห้ง

$$\text{และน้ำหนักที่แท้จริงตัวอย่าง หรือ น้ำหนักอบแห้ง} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างสด}}{1 + (\% \text{ ปริมาณความชื้น} / 100)}$$

2. การหาปริมาณสารแทรกที่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์เอทานอล-เบนซีน

2.1 ทำความสะอาดด้วยแก้วสกัดสารแทรก (Soxhlet extraction cup) และอบแห้ง ชั่งน้ำหนักให้แน่นอน

2.2 ชั่งผงตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแห้ง 4 กรัม สำหรับไม้ และ 10 กรัมสำหรับเชื้อ พร้อมครอบด้วยตะแกรงละเอียดรูปกรวยแล้วใส่ลงในถ้วยกรอง บรรจุใส่ลงในเครื่องมือสกัดสารแทรก

2.3 ติดตั้งเครื่องสกัดสารแทรก สกัดด้วยสารผสมเอทานอล-เบนซีน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร โดยการควบคุมอุณหภูมิและจุดเดือดตัวทำละลาย ซึ่งใช้เวลาในการสกัดสารแทรกที่ละลายในตัวทำ

ละลายเอทานอล-เบนซีน เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง ระบายไล่ตัวทำละลายออกจากถ้วยแก้วสกัดสาร แตรก

2.4 นำถ้วยแก้วสกัดสารแตรกไปอบแห้งในเตาอบที่อุณหภูมิ $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น นำมาชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำจนกระทั่งน้ำหนักคงที่

2.5 ทำ blank โดยการนำตัวทำละลายเอทานอล-เบนซีน 150 มิลลิลิตร ไประบายไล่ตัวทำละลายออกจากถ้วยแก้วสกัดสารแตรก และทำทำนองเดียวกันกับข้อ 2.4

2.6 คำนวณหาปริมาณน้ำหนักสารแตรกที่สกัดได้จาก

$$\% \text{ ปริมาณสารแตรกที่ละลายในเอทานอล-เบนซีน} = 100(W_e - W_b)/W_p$$

โดยที่	W_e	คือ	น้ำหนักปริมาณสารที่สกัดได้อบแห้ง (กรัม)
	W_b	คือ	น้ำหนัก blank อบแห้ง (กรัม)
	W_p	คือ	น้ำหนักตัวอย่างผงอบแห้ง (กรัม)

3. การเตรียมวัตถุดิบที่ปราศจากสารแตรก

3.1 ทำความสะอาดถ้วยแก้วสกัดสารแตรก (Soxhlet extraction cup) และอบแห้ง ชั่งน้ำหนักให้แน่นอน

3.2 ชั่งผงตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแห้ง 20 กรัม โดยเทียบน้ำหนักอบแห้งแล้วใส่ลงในถ้วย กรองพร้อมครอบด้วยตะแกรงละเอียดรูปกรวยแล้วใส่ลงในถ้วยกรอง บรรจุใส่ลงในเครื่องมือสกัด สารแตรก

3.3 ติดตั้งเครื่องสกัดสารแตรก สกัดด้วยตัวทำละลายผสมเอทานอล-เบนซีน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง โดยรักษาระดับการชะล้างไม่น้อยกว่า ชั่วโมงละ 4 ครั้ง

3.4 กรองผงตัวอย่างโดยเทลงใน Buchner funnel เพื่อดูดตัวทำละลายออก ล้างถ้วยกรอง และผงตัวอย่างด้วยเอทานอลเพื่อไล่เบนซีนออก

3.5 ใส่ผงดังกล่าวลงในถ้วยกรองอีก บรรจุใส่ในเครื่องมือสกัดสารแตรก

3.6 ติดตั้งเครื่องสกัดสารแตรก สกัดด้วยเอทานอลเป็นเวลา 4 ชั่วโมงจนกระทั่งเอทานอล ไม่มีสี

3.7 ถ่ายตัวอย่างลงใน Buchner funnel และล้างถ้วยกรองและตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นเพื่อไล่เอทานอล

3.8 ถ่ายตัวอย่างลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 1 ลิตร และเติมน้ำกลั่นที่กำลังเดือด 500 มิลลิลิตร ให้ความร้อนแก่พลาสติกเป็นเวลา 1 ชั่วโมงในอ่างน้ำร้อน รักษาอุณหภูมิที่จุดเดือด กรองตัวอย่างด้วย Buchner funnel และล้างด้วยน้ำกลั่นที่เดือดปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผึ่งตัวอย่างทิ้งไว้ในอากาศให้แห้ง

3.9 คลุกเคล้าตัวอย่างและเก็บไว้ในภาชนะที่ปิดมิดชิด หาค่าปริมาณความชื้นของวัตถุดิบที่ปราศจากสารแทรก และนำตัวอย่างที่เตรียมได้ วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี

3.10 หาปริมาณความชื้นของวัตถุดิบที่ปราศจากสารแทรก จากตัวอย่าง ข้อ 3.9

4. การหาปริมาณลิกนินที่ไม่ละลายในกรดในวัตถุดิบและเยื่อ

มาตรฐาน Tappi T222 om-98

4.1 ชั่งผงตัวอย่างที่ปราศจากสารแทรก 1 กรัม โดยเทียบน้ำหนักอบแห้ง

4.2 เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 72 ลงไป 15 มิลลิลิตร คนให้กระจายสม่ำเสมอ นาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

4.3 เทสารละลายใน Erlenmeyer flask ขนาด 1 ลิตร แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำ 560 มิลลิลิตร

4.4 นำเข้าเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 120 นาที ทิ้งให้เย็น

4.5 กรองผ่านถ้วยกรอง (Glass filter) ที่ทราบน้ำหนักแห้ง

4.6 นำถ้วยกรองและตะกอนไปอบแห้งที่ 150 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ นำไปชั่งและคำนวณหาปริมาณลิกนิน (acid-insoluble lignin)

$$\% \text{ acid-insoluble lignin} = 100(W1/W2)$$

โดยที่ W1 คือ น้ำหนักลิกนินอบแห้ง (กรัม)

W2 คือ น้ำหนักอบแห้งของตัวอย่าง (กรัม)

4.7 ส่วน Filtrate ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปวัด Absorbance ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 205 นาโนเมตร

4.8 ถ้า Absorbance มีค่ามากกว่า 0.7 ให้ทำการเจือจางและบันทึก Diluting number ไว้

4.9 จากค่า Absorbance คำนวณค่า acid-insoluble lignin จากสูตร

$$\% \text{ acid-insoluble lignin} = \frac{\text{Diluting No.} \times \text{Absorbance} \times 100}{113 \times \text{Sample dry TISTR.}}$$

5. การหาปริมาณไฮโดรเซลลูโลสของวัตถุดิบ

ตามมาตรฐาน TAPPI T203 om-88

5.1 ชั่งผงตัวอย่างที่ปราศจากสารแทรกกลลงในกระดวยฟอยด์โดยน้ำหนักอบแห้ง 3 กรัม ถ่ายผงเยื่อลงในขวดกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร

5.2 เติมน้ำกลั่นลงในขวดกรวยปริมาตร 160 มิลลิลิตร และอะซิติกเข้มข้นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับโซเดียมคลอไรด์ 1.5 กรัม ลงไปตามลำดับ แล้วใช้ขวดกรวยขนาดเล็กว่ำเอาทางหัวลงปิดปากขวดกรวยที่ใส่ผงตัวอย่างนั้น นำไปตั้งในอ่างที่ควบคุมอุณหภูมิระหว่าง 70-80 °C นาน 1 ชั่วโมง โดยทำการทดลองในตู้ดูดควันพิษมีการเขย่าเป็นระยะจะได้ก๊าซคลอรีนไดออกไซด์ (ClO₂) และมีการทำปฏิกิริยากับลิกนินในผงตัวอย่าง

5.3 เมื่อครบ 1 ชั่วโมง เติมกรดอะซิติกเข้มข้นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และโซเดียมคลอไรด์ 1.5 กรัม ลงไปตามลำดับในขวดกรวยเขย่าเป็นระยะเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำนองเดียวกันนี้ไปอีก 2, 3 และ 4 ชั่วโมง หรือจนกว่าผงตัวอย่างจะมีสีขาว

5.4 เมื่อครบกำหนดเวลา นำขวดชมพูไปแช่ลงในอ่างน้ำแข็งเพื่อให้ก๊าซพิษลดการกระจายเป็นเวลา 30 นาที

5.5 กรองผงเยื่อด้วยถ้วยกรองเบอร์ 2 ที่ทราบน้ำหนักอบแห้งละเอียดถึง 0.1 มิลลิกรัม โดยใช้เครื่องกรองที่มีแรงดูดจากการไหลผ่านของน้ำที่ป้อนลมครบชุด ทำให้ก๊าซพิษที่ฟุ้งกระจายออกมาจากสารละลายจะถูกดูดและละลายไปกับน้ำ

5.6 ล้างผงไฮโดรเซลลูโลสด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งมีสีขาวจึงล้างด้วยอะซิโตนและดูดส่วนของเหลวออกมาให้มากที่สุด

5.7 นำไฮโดรเซลลูโลสไปผึ่งให้แห้งในบรรยากาศและทำให้แห้งในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนักและเก็บตัวอย่างผงไว้วิเคราะห์หาแอลฟาเซลลูโลสต่อไป

5.8 นำถ้วยกรองไฮโดรเซลลูโลสบางส่วนไปใส่ในเตาอบที่อุณหภูมิ 105 ± 3 °C อย่างน้อย 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนักทำซ้ำจนกระทั่งน้ำหนักคงที่

5.9 นำผลที่ได้ไปคำนวณปริมาณไฮโดรเซลลูโลสเป็นร้อยละ

$$\% \text{ ปริมาณไฮโดรเซลลูโลส} = 100(W1/W2)$$

โดยที่ W1 คือ น้ำหนักอบแห้งของไฮโดรเซลลูโลส (กรัม)
W2 คือ น้ำหนักอบแห้งของผงตัวอย่าง (กรัม)

6. การหาปริมาณแอลฟาเซลลูโลส

ตามมาตรฐาน TAPPI T203 om-88

6.1 ชั่งไฮโดรเซลลูโลสที่ทราบน้ำหนักอบแห้งแน่นอน 2 ± 0.2 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ทรงสูง ขนาด 300 มิลลิลิตร

6.2 เติมน้ำละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 17.5 ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ลงไปและปรับอุณหภูมิของสารละลายโดยนำไปใส่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 0.2 องศาเซลเซียส

6.3 คนสารละลายด้วยเครื่องกระจายจนเกิดการกระจายอย่างสมบูรณ์ โดยมีให้เกิดฟองอากาศเป็นเวลา 5 นาที

6.4 ล้างเครื่องกระจายด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 17.5 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

6.5 คนสารละลายด้วยแท่งแก้วแล้วนำไปแช่ไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิอีก 30 นาที

6.6 เติมน้ำกลั่นลงในสารละลาย 100 มิลลิลิตร แล้วคนด้วยแท่งแก้วทิ้งไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิอีก 30 นาที

6.7 กรองสารละลายด้วยถ้วยกรองเบอร์ 2

6.8 ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่มีความเย็น 20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเป็นฟิเอชเป็นกลาง

6.9 ล้างตะกอนต่อไปด้วยกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยแช่ตะกอนทิ้งไว้ 5 นาที

6.10 ล้างตะกอนครั้งสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นจนน้ำที่ล้างไม่มีสภาพเป็นกรด

6.11 นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 105 ± 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาใส่โถดูดความชื้น ทิ้งให้เย็นชั่งจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ นำผลมาคำนวณหาปริมาณแอลฟาเซลลูโลส

$$\% \text{ ปริมาณแอลฟาเซลลูโลส} = 100(W1/W2)$$

โดยที่ W1 คือ น้ำหนักอบแห้งของแอลฟาเซลลูโลส (กรัม)
 W2 คือ น้ำหนักอบแห้งของผงตัวอย่าง (กรัม)

7. การปริมาณแพนโตแซน

ตามมาตรฐาน TAPPI T223 om-84

7.1 ใส่ผงตัวอย่างปราศจากสารแทรกสำหรับเนื้อไม้ใบกว้าง 0.3 กรัม และไม้ใบแคบ 0.7 กรัม เชื้อที่ไม่ได้ฟอกเนื้อไม้ใบกว้าง 1 กรัม จากเนื้อไม้ใบแคบ 2 กรัม หรือเชื้อฟอกจากเนื้อไม้ใบกว้าง 3 กรัม และจากเนื้อไม้ใบแคบ 5 กรัม ใน Boiling flask และใส่ฟลักโซเดียมคลอไรด์จำนวน 20 กรัม และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3.85 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร พร้อมด้วย ลูกแก้ว (Boiling stone) 2-3 เม็ด

7.2 ติดตั้ง Boiling flask เข้าเครื่องกลั่น และทำเครื่องหมายระดับของสารละลายกรดไว้ เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3.85 นอร์มอล ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ลงใน Separatory funnel

7.3 ให้ความร้อนด้วยตะเกียงเบนเซนหรือเตาไฟฟ้าที่ทำให้กรดกลั่นตัวในอัตราเร็วที่สม่ำเสมอ นาทีละ 2.5 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่กลั่นได้ซึ่งเป็นเฟอร์ฟูรอลใน Volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่วางอยู่บนอ่างน้ำแข็ง

7.4 ในระหว่างการกลั่นจะต้องรักษาสารละลายกรดหรือเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกจาก Separatory funnel หรือเติมสารละลายกรดจาก Separatory funnel ทุก 10 นาที ครั้งละ 25 มิลลิลิตร กลั่นต่อไปจนครบเวลา 90 ± 5 นาที จะได้สารละลายที่กลั่น 225 ± 10 มิลลิลิตร

7.5 ปรับอุณหภูมิของสารละลายที่กลั่นให้เป็น 20 องศาเซลเซียส เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3.85 นอร์มอล ให้ครบปริมาตร 250 มิลลิลิตร ใน Volumetric flask และผสมให้เข้ากันโดยตลอด

7.6 ดูดสารละลายที่กลั่นด้วยปิเปตปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Orcinol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่า และวางฟลasks ในอ่างอุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ± 5 นาที

7.7 เติมเอทานอลให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเขย่า นำไปวางในอ่างอุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ± 5 นาที

7.8 นำสารละลายที่เตรียมไว้ใส่ใน Cuvettes ที่มีฝาปิดป้องกันการระเหยของกรดที่กักกร่อนเครื่องมือไปวัดค่า Absorbance ของสารละลายด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร

7.9 อ่านค่าไฮโดรเจนในตัวอย่างจากกราฟ Calibration ที่เตรียมไว้เป็น มิลลิกรัม แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณเพนโตแซน

$$\% \text{ ปริมาณเพนโตแซน} = W1/10W2$$

โดยที่ W1 คือ น้ำหนักไฮโดรเจนในผงตัวอย่าง (มิลลิกรัม)
W2 คือ น้ำหนักอบแห้งของผงตัวอย่าง (มิลลิกรัม)

7.10 การเตรียม Calibration

7.10.1 ทำไฮโดรไลสให้แห้งในสุญญากาศ (Vacuum oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

7.10.2 ชั่งไฮโดรไลสที่แห้งจำนวน 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัม จำนวน 5 ชุด

7.10.3 ใส่ไฮโดรไลสแต่ละน้ำหนักที่เตรียมไว้ใน Boiling flask และทำการกลั่นทำนองเดียวกับผงตัวอย่าง

7.10.4 วัดค่าการดูดกลืนของสารละลายที่กลั่นได้แต่ละน้ำหนักของไฮโดรไลสที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร และให้ใช้ Blank เป็นสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3.85 นอร์มอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเป็น Reference solution

7.10.5 คำนวณไฮโดรเจนในตัวอย่างเป็นมิลลิกรัม

$$\text{ไฮโดรเจน (มิลลิกรัม)} = \text{ไฮโดรไลส} \times 0.88$$

7.10.6 สร้างกราฟจากปริมาณไฮโดรไลสต่างๆ 5 ค่า โดยความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างปริมาณไฮโดรเจนกับค่า Absorbance ที่ได้

8. การวิเคราะห์หาน้ำตาล monosaccharide ด้วยวิธี HPLC

8.1 กรณี ตัวอย่างเป็นของแข็ง

8.1.1 ชั่งตัวอย่างไม้บดแห้งที่ทราบน้ำหนักแน่นอนที่ผ่านตะแกรงขนาด 40 เมช แต่ไม่ผ่าน 60 เมช ปริมาณ 0.12 กรัม ใส่หลอดทดลอง

8.1.2 เติม 72% H_2SO_4 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

8.1.3 เทสารละลายลงในขวดที่มีฝาปิดขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 4 มิลลิลิตร พร้อมปิดฝา

8.1.4 นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

8.1.5 ปิเปตสารละลายที่ได้จากข้อ 8.1.4. ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์ พร้อมกับใส่ $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ของแข็ง 1 กรัม และปรับพีเอชให้เป็นกลาง (พีเอชเท่ากับ 7-8) ด้วยสารละลาย $\text{Ba}(\text{OH})_2$ อิ่มตัว

8.1.6 นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,800 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที

8.1.7 นำส่วนที่เป็นสารละลายมาปรับปริมาตรเป็น 50 มล. ด้วยขดวัดปริมาตร

8.1.8 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 8.1.7 กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

8.1.9 ปิเปตสารละลายที่ได้ 0.9 มิลลิลิตร ผสมกับ internal standard 0.1 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

8.2 กรณี ตัวอย่างเป็นของเหลว (สารละลายหลังระเบิด)

8.2.1 นำตัวอย่างของเหลวปรับพีเอชให้เป็นกลาง (พีเอชเท่ากับ 7-8) ด้วยสารละลาย $\text{Ba}(\text{OH})_2$ อิ่มตัว

8.2.2 นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,800 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที

8.2.3 นำส่วนที่เป็นสารละลายมาปรับปริมาตรเป็น 50 มล. ด้วยขดวัดปริมาตร

8.2.4 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 4 กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

8.2.5 ปิเปตสารละลายที่ได้ 0.9 มล. ผสมกับ internal standard 0.1 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

8.3 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ในการหาน้ำตาลชนิดต่างๆ

8.3.1 สภาพของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการหาน้ำตาล

เครื่อง : High performance liquid chromatography ของบริษัท Shimadzu (Class LC10)

ประเทศญี่ปุ่น

คอลัมน์ : Aminex HPX-87C column (Bio-Rad)

Detector : Refractive index (RI) detector

Mobile phase: น้ำดีไอออน

สภาวะที่ใช้: อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

อัตราการไหล : 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที

วิธีการวิเคราะห์ : การคำนวณค่าแบบ internal standard โดยใช้น้ำตาลอินโนซิทอลเป็นน้ำตาลมาตรฐานในการอ้างอิง

8.3.2 การหาค่า Retention time ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

ก. เตรียมสารละลายน้ำตาลแต่ละชนิด (รวมทั้ง internal standard) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข. กรองสารละลายผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร

ค. ฉีดสารละลายน้ำตาลแต่ละชนิดปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง

HPLC จะได้ค่า Retention time ของน้ำตาลแต่ละชนิดรวมทั้งค่า Retention time ของ internal standard

8.3.3 การหาค่า Response Factor (RF) ของน้ำตาลมาตรฐานแต่ละชนิด

ก. เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นระดับต่างๆ 5 ระดับ คือ 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข. เตรียมสารละลายน้ำตาล internal standard ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 1 กรัมต่อลิตร ด้วยการ ชั่งน้ำตาล internal standard 0.1 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้สารละลาย 100 มิลลิลิตร

ค. กรองสารละลายผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร

ง. ที่แต่ละความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ทำการเติมสารละลายน้ำตาลกลูโคส 0.9 มล. ลงในหลอดขนาด 1 มล. แล้วเติมสารละลาย internal standard 0.1 มล. ทำการผสมให้เข้ากัน และฉีดสารละลายนี้ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าสู่เครื่อง HPLC

จ. คำนวณหาค่า RF ของแต่ละค่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ก่อนนำมาหาค่าเฉลี่ยของ RF

ฉ. เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาล โซโลส กาแลกโตส อะราบินอส ไชลิทอล และแมนโนส ตามลำดับแล้วทำซ้ำ ข้อ ก.- จ.

8.3.4. ทำการคำนวณหาค่า Response Factor (RF) ที่แต่ละความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่างๆ จากสมการดังนี้

$$RF = \frac{As \times Ci}{Ai \times Cs}$$

เมื่อ	RF	คือ	Response Factor ของน้ำตาลที่แต่ละความเข้มข้น
	Cs	คือ	ความเข้มข้นของน้ำตาลตัวอย่าง, มิลลิกรัมต่อลิตร
	Ci	คือ	ความเข้มข้นของ internal standard, มิลลิกรัมต่อลิตร
	As	คือ	พื้นที่ peak ของน้ำตาล ตัวอย่าง
	Ai	คือ	พื้นที่ peak ของ internal standard

การคำนวณหาปริมาณน้ำตาลจากค่า response factor (RF) ได้จากสมการ

$$Cs = \frac{(As \times Ci)}{(Ai \times RF)}$$

โดยค่า RF ที่ใช้ในสมการ คือ ค่า response factor เฉลี่ยของน้ำตาลแต่ละชนิด

หมายเหตุ

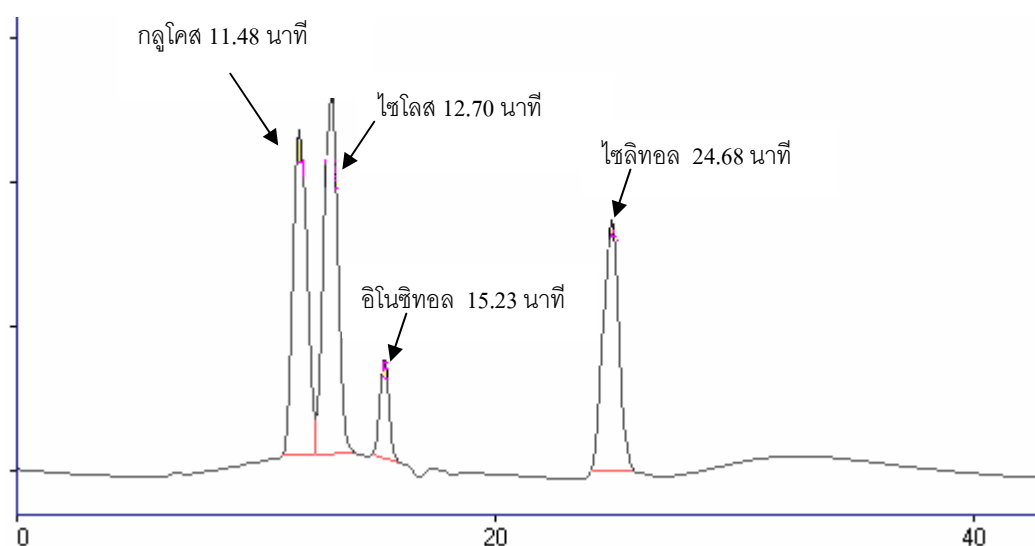
- การทดสอบความแม่นยำในการวิเคราะห์ของเครื่อง HPLC โดยเมื่อได้ค่า RF เฉลี่ยแล้วทำการทดสอบโดยฉีดน้ำตาลที่รู้ค่าความเข้มข้นที่แน่นอนเข้าเครื่อง HPLC แล้วคำนวณกลับเป็น % recovery ของน้ำตาล คำนวณโดยใช้ค่า RF เฉลี่ย
- ความเข้มข้นของตัวอย่างที่วิเคราะห์อยู่ในช่วง 0-100 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการวิเคราะห์ค่าน้ำตาลแต่ละชนิดแต่ละความเข้มข้นแล้วคำนวณค่า RF เกลี่ยและ Retention time ได้ผลดังนี้

ตารางผนวกที่ ข1 แสดงค่าประมาณ Retention time และ RF เกลี่ย ของน้ำตาลแต่ละชนิด

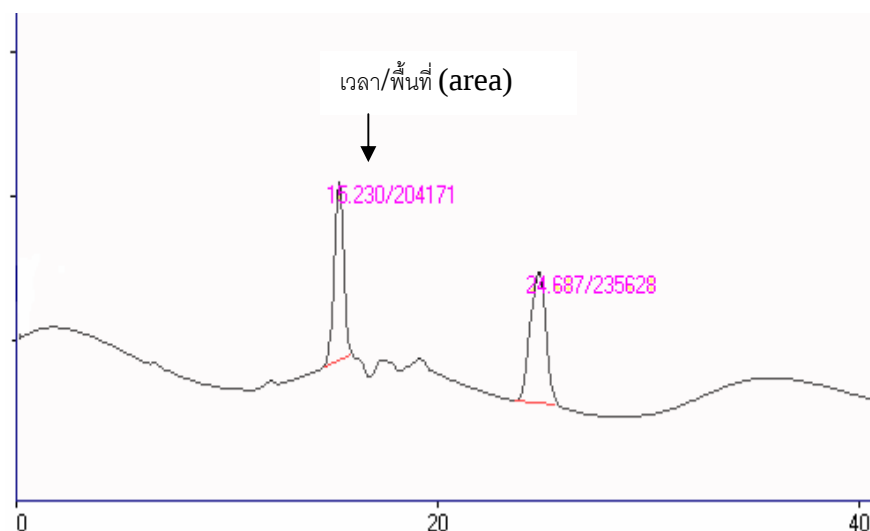
ชนิดของน้ำตาล	ค่าประมาณ Retention time (นาที)	RF เกลี่ย
กลูโคส	11.48	0.84
ไซโลส	12.70	0.69
ไซลิทอล	24.68	1.27
กาแลกโตส	13.29	0.96
แมนโนส	13.71	1.07
อะราบิโนส	19.26	0.78
อินโนซิทอล	15.23	1.27

กราฟแสดงค่า Retention time (นาที) ของน้ำตาลที่วิเคราะห์พบในตัวอย่าง



ภาพผนวกที่ ข1 แสดงลักษณะของพีคของน้ำตาลชนิดต่างๆ และเวลาที่ปรากฏในการตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC

กราฟแสดงตัวอย่างการคำนวณน้ำตาลจากพีคที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC



ภาพผนวกที่ ข2 แสดงลักษณะพีคที่ปรากฏของน้ำตาลในตัวอย่างการคำนวณ

จากกราฟ พบว่า ปรากฏพีคขึ้น 2 พีค คือ ที่เวลา ที่ 15.23 นาที แสดงว่าเป็นพีคของน้ำตาลอินโนซิทอลซึ่งเป็นน้ำตาลมาตรฐานตัวอ้างอิง กับที่เวลา 24.68 นาที แสดงว่าเป็นพีคของน้ำตาลไซลิทอล สรุปได้ว่าจากกราฟ ทำให้ทราบว่าในตัวอย่างที่ฉีดเข้าเครื่อง HPLC มีน้ำตาล 2 ชนิด คือ อินโนซิทอลกับน้ำตาลไซลิทอล จากนั้นนำค่าตัวเลขที่ปรากฏมาคำนวณค่าความเข้มข้นไซลิทอลในตัวอย่าง

จากเดิมในการทดลอง ใช้น้ำตาลอินโนซิทอลความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ขวดสำหรับฉีด HPLC ขนาด 1 มิลลิลิตร ผสมกับตัวอย่าง ปริมาตร 0.9 มิลลิกรัม ก็จะได้ความเข้มข้นในขวดสำหรับฉีด HPLC ของน้ำตาลอินโนซิทอลเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนตัวอย่างในขวดมีความเข้มข้นหาได้จากสูตร

$$Cs = \frac{(As \times Ci)}{(Ai \times RF_{\text{เฉลี่ย}})}$$

โดยค่า $RF_{\text{เฉลี่ย}}$ ของน้ำตาลไซลิทอล เท่ากับ 1.27 แทนค่าในสูตร จะได้

$$Cs = \frac{235628 \times 100}{204171 \times 1.27} = 90.87 \text{ มิลลิกรัมต่อลิตร}$$

ความเข้มข้นที่ได้เท่ากับ 90.87 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ ความเข้มข้นตัวอย่างที่อยู่ในสารละลาย 1 มิลลิลิตร แต่แท้จริงแล้ว ความเข้มข้นตัวอย่างที่ 0.9 มิลลิลิตร

หาได้จาก $M_1V_1 = M_2V_2$

โดยที่ M_1 เท่ากับความเข้มข้นตัวอย่างใน 1 มิลลิลิตร V_1 เท่ากับ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
 M_2 เท่ากับความเข้มข้นตัวอย่างใน 1 มิลลิลิตร V_2 เท่ากับ ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร

แทนค่าจะได้ $90.87 \times 1 = M_2 \times 0.9$ จะได้ค่า M_2 เท่ากับ 100.97 มิลลิกรัมต่อลิตร
 เพราะฉะนั้น ในตัวอย่างมีความเข้มข้นน้ำตาลไซลิทอลที่แท้จริง เท่ากับ 100.97 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรณี หาค่าความแม่นยำของเครื่อง HPLC

จากกราฟภาคผนวกที่ 2 สมมุติทราบค่าความเข้มข้นที่แน่นอนของน้ำตาลไซลิทอล จากการคำนวณและเตรียมสารได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อคำนวณจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า มีค่าความเข้มข้นของไซลิทอลเท่ากับ 100.97 มิลลิกรัมต่อลิตร หาค่าความแม่นยำของเครื่อง HPLC โดย

ถ้าความเข้มข้นไซลิทอลที่ได้จากการวิเคราะห์ HPLC เป็น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นค่าความแม่นยำเครื่อง HPLC 100 เปอร์เซ็นต์ แต่จากการวิเคราะห์จากเครื่อง HPLC จริงได้ค่าความเข้มข้น 100.97 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงคิดเป็นค่าความแม่นยำของเครื่อง HPLC เท่ากับ $(100 \times 100.97) / 100 = 100.97$ เปอร์เซ็นต์

จะได้ ค่าคลาดเคลื่อนความแม่นยำ เท่ากับ $100.97 - 100 = 0.97$ เปอร์เซ็นต์

ฉะนั้น ค่าความแม่นยำของเครื่อง HPLC เท่ากับ 100 ± 0.97 เปอร์เซ็นต์

9. การวิเคราะห์เฟอร์ฟูรอล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล โดยวิธี HPLC

สถานะของเครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์เฟอร์ฟูรอล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล

เครื่อง : High performance liquid chromatography ของบริษัท Shimazu (Class LC10)

ประเทศญี่ปุ่น

คอลัมน์ : Aminex HPX-87H column (Bio-Rad) Exclusion column 300× 7.8 mm.

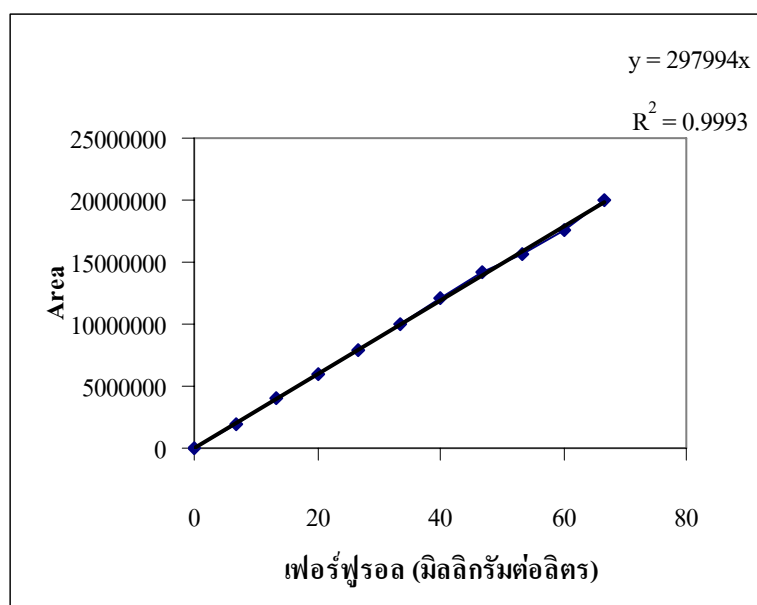
Detector : UV detector ที่ความยาวคลื่น 280 nm.

Mobile phase: สารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น 0.005 M

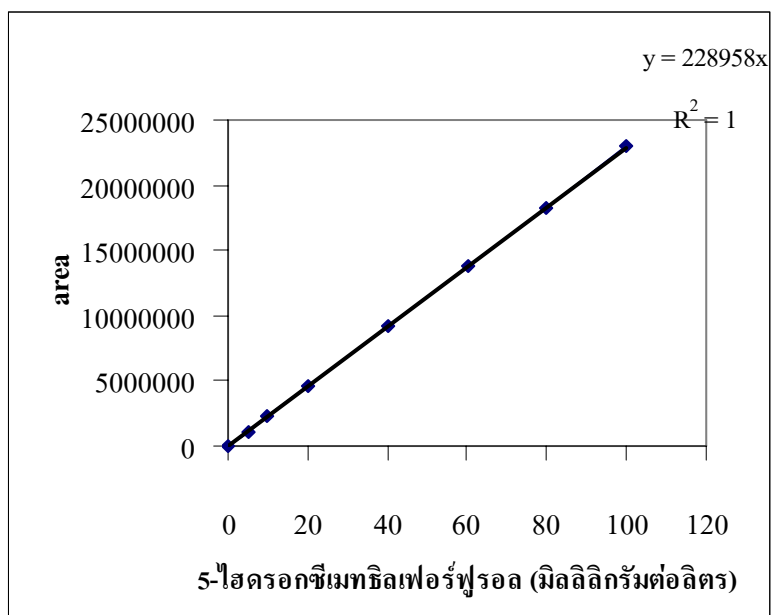
สภาวะที่ใช้ : อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

อัตราการไหล : 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที

วิธีการวิเคราะห์ : การวิเคราะห์ สาร โดยการสร้างกราฟมาตรฐานแบบ external standard ของเฟอร์ฟูรอลและ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอลอยู่ในช่วงความเข้มข้นต่างๆ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งได้ผลดังนี้



ภาพผนวกที่ ข3 แสดงกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นเฟอร์ฟูรอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC



ภาพผนวกที่ ข4 แสดงกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้น 5- ไฮดรอกซีเมทิลเฟอรฟูรอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

และสามารถสรุปแสดงเป็นตารางได้ดังนี้

ตารางผนวกที่ ข2 แสดงค่า Retention time และสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของเฟอรฟูรอล และ 5- ไฮดรอกซีเมทิลเฟอรฟูรอลจากเครื่อง HPLC

ชนิดของสาร	Retention time (นาที)	สมการ
เฟอรฟูรอล	40.39	$y = 297994x$
5- ไฮดรอกซีเมทิลเฟอรฟูรอล	27.27	$y = 228958x$

10. การวิเคราะห์กรดอะซิดิก โดยวิธี HPLC

สภาวะของเครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์กรดอะซิดิก

เครื่อง : High performance liquid chromatography ของบริษัท Shimazu (Class LC10)
ประเทศญี่ปุ่น

คอลัมน์ : Aminex HPX-87H column (Bio-Rad) Exclusion column 300× 7.8 mm.

Detector : UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 nm.

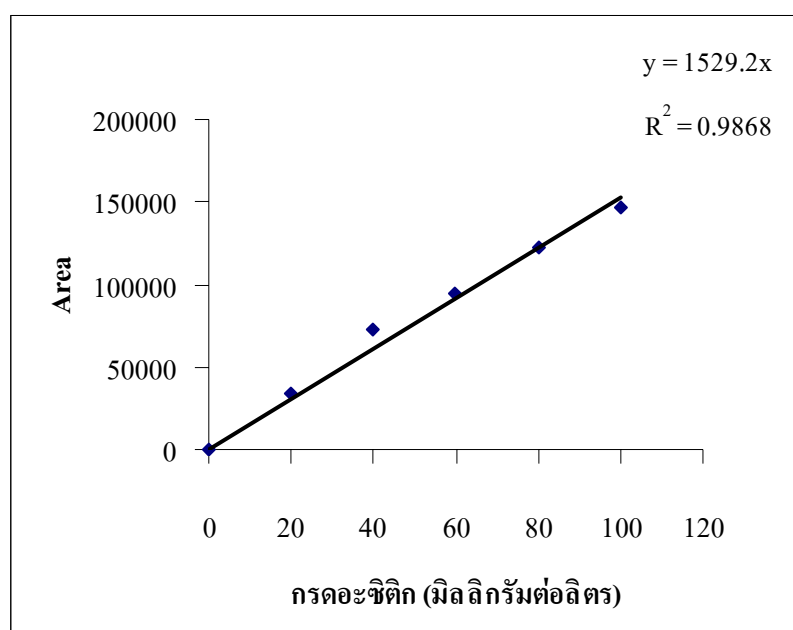
Mobile phase: สารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น 0.005 N

สภาวะที่ใช้: อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

อัตราการไหล : 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที

วิธีการวิเคราะห์: การวิเคราะห์ สารโดยการสร้างกราฟมาตรฐานแบบ external standard ของ

กรดอะซิดิกในช่วงความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร
ซึ่งได้ผลดังนี้



ภาพผนวกที่ ข5 แสดงกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นกรดอะซิดิกจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

และสามารถสรุปแสดงเป็นตารางได้ดังนี้

ตารางผนวกที่ ข3 แสดงค่า Retention time และสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของกรดอะซิดิกจากเครื่อง HPLC

ชนิดของสาร	Retention time (นาที)	สมการ
กรดอะซิดิก	5.94 และ 14.43	$y = 1529.2x$

11. การวิเคราะห์ Total phenolic compound

โดยวิธี Folin & Ciocalteus reagent ที่ $\lambda = 735 \text{ nm}$.

11.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน ของ Tannic acid เข้มข้น 100 โดยชั่ง Tannic acid 10 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร

11.2 ปิเปตสารละลายจากข้อ 1 ปริมาตร 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร

11.3 เติม 1 มิลลิลิตร ของ Folin-ciocalteu phenol reagent ลงในข้อ 2 พร้อมเขย่า

11.4 เติม 20% Na_2CO_3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

11.5 ทิ้งไว้ 20 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง (Abs) ด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 735 นาโนเมตร

11.6 สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง Abs กับความเข้มข้น Tannic acid ที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

11.7 วิเคราะห์สารตัวอย่างโดยเจือจางตัวอย่าง 10 เท่า แล้วไปเปต 1 ml. ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วทำตามข้อ 3-5

11.8 หาค่า Total phenolic compound จากกราฟ แล้วคูณค่าการเจือจาง

12. การวิเคราะห์สี

วิเคราะห์สีโดยวิธี Platinum-cobalt method of measuring colour

12.1 ละลาย Potassium Chloroplatinate, K_2PtCl_6 (ซึ่งประกอบด้วย platinum 0.5 กรัม) และ 1 กรัมของ Cobaltouse chloride, CoCl_2 (ซึ่งประกอบด้วย cobalt 0.248 กรัม) ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จะได้ค่า standard color เท่ากับ 500

12.2 ทำการเจือจางสารละลายในข้อ 1 ให้ได้ค่า standard color เท่ากับ 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 และ 70 unit of colour โดยปิเปตมา 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

12.3 นำสารละลายที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ตัวอย่างดูดกลืนมากที่สุด ในช่วง 400-700 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer

12.4 สร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่า Abs กับค่า standard color เท่ากับ 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 และ 70

12.5 ทำการวัดค่า Abs ของสารละลายตัวอย่างที่มีค่าความเข้มข้นน้อยกว่า 70 unit of colour โดยการเจือจาง

12. การเจริญของเซลล์

วิเคราะห์การเจริญของเซลล์โดยการวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (V-530 uv/vis Spectrophotometer) ของบริษัท Jasco ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร สำหรับเชื้อยีสต์ *Candida magnolia* TISTR 5664 และความยาวคลื่น 600 สำหรับเชื้อยีสต์ *Candida guilliermondii* FTI 20037 โดยนำตัวอย่างมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีค่าความขุ่นอยู่ในช่วง 0.05-0.70 แล้วเปรียบเทียบเป็นน้ำหนักแห้งกับกราฟมาตรฐาน

การหาน้ำหนักเซลล์แห้งทำโดย เก็บตัวอย่างเซลล์ระยะปลาย log phase ของการเจริญของเซลล์ นำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ และล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นทำซัสเพนชันของเซลล์ให้เจือจางให้มีค่าความขุ่นอยู่ในช่วง 0.05-0.70 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร สำหรับเชื้อยีสต์ *Candida magnolia* TISTR 5664 และความยาวคลื่น 600 สำหรับเชื้อยีสต์ *Candida guilliermondii* FTI 20037 จากนั้นนำซัสเพนชันของเซลล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ไปหาน้ำหนักแห้งโดยนำจานอวลูมิเนียมไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วนำไปชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน นำเซลล์ที่เตรียมได้ถ่ายลงในจานอวลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วนำตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น นำไปชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน แล้วนำค่าจานอวลูมิเนียมมาลบออก ผลที่ได้จะเป็นน้ำหนักแห้งของเซลล์ยีสต์ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของเซลล์ที่ระดับต่างๆ กับค่าน้ำหนักเซลล์แห้งไปสร้างกราฟมาตรฐาน

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเลี้ยงเหล่านี้ปรับพีเอชให้มีค่าตามต้องการด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH แล้ว
 นิ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เวลา 15 นาที ยกเว้น
 อาหารที่มีน้ำตาลไซโลส และยูเรีย เป็นองค์ประกอบให้แยกทั้งสองออกจากองค์ประกอบอื่น โดย
 น้ำตาลไซโลสนิ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาทีและยูเรียทำให้ปราศจาก
 เชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรน

1.YPX broth

Yeast extract	10	กรัมต่อลิตร
Peptone	10	กรัมต่อลิตร
D-xylose	20	กรัมต่อลิตร

2.YPD agar slant

Yeast extract	10	กรัมต่อลิตร
Peptone	10	กรัมต่อลิตร
D-glucose	20	กรัมต่อลิตร

3. Basal medium

Yeast nitrogen base	1.7	กรัมต่อลิตร
(W/O amino acid และ ammonium sulfate)		

ถ่านกัมมันต์ (Activated carbon)

จากบริษัท ซี. ไอแกนติก คาร์บอน จำกัด มีคุณสมบัติถ่านกัมมันต์มี ดังนี้

1. ทำมาจากไม้ยูคาร์ลิปตัส
2. Type No. CG200U
3. Lot No. 480524-U059
4. Moisture(ASTM D 2867) 10.0 %
5. Ash content (ASTM D 2863) 11.3%
6. pH Value (ASTM D 3838) 10.4
7. Bulk Density (ASTM D 2854) 0.39 gm/c.c.
8. Iodine Absorption(ASTM D 4607) 1018.2 mg/gm
9. Particle Size Distribution (ASTM D 2862)
 - + 200 mesh = 3.9 %
 - 200 mesh = 96.1 %



ภาพผนวกที่ ค1 แสดงเครื่องระเบิดด้วยไอน้ำของบริษัท Kitto Koatsu ประเทศญี่ปุ่น ชนิดทำงานเป็นครั้ง (batch) ขนาดความจุ 2.5 ลิตร



ภาพผนวกที่ ค2 แสดงเครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ของบริษัท Shimadzu (class LC10A) ประเทศญี่ปุ่น