ภาคผนวก

ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์

1. จำนวนเซลล์มีชีวิต

เจือจางตัวอย่างด้วยเทคนิค Serial ten fold dilution ในสารละลาย 0.85 % NaCl จากนั้นไปเปตสารละลายตัวอย่าง 0.1 ml ลงในอาหาร MRS agar (MRS-broth+1.5% agar) เพื่อการ Pour plate บ่มที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนับจำนวนโคโลนีแล้วคำนวณจำนวนเซลล์มีชีวิตทั้งหมดดังนี้

จำนวนเซลล์มีชีวิต (cfu/ml) = จำนวนโคโลนี x อัตราการเจือจาง

จำนวนเซลล์มีชีวิต (cfu/g DM) = (จำนวนโคโลนี x อัตราการเจือจาง)/% DM

2. น้ำหนักเซลล์แห้ง

แยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธีการหมุนเหวี่ยงที่ 5000 rpm เป็นเวลา 15 min นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

3. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

นำสารละลายเชื้อ 1 ml ไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 4˚C เป็นเวลา 15 min นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1959) ดังนี้

ดูดสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการแยกเซลล์ออกแล้ว 1 ml เติมด้วยสารละลาย DNS ที่มีความเข้มข้น 1% จำนวน 2 ml นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 min จากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็นอีก 5 min เติมด้วยน้ำกลั่น 20 ml ให้เข้ากันดีด้วยเครื่อง Vortex แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm คำนวณปริมาณน้ำตาลโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคสที่ความเข้มข้น 0-1 mg/ml ดังนี้

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/l)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง x อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

4. **วัตถุแห้งของผงผลิตภัณฑ์**

ชั่งตัวอย่างผงผลิตภัณฑ์ประมาณ 0.5 g ใส่ลงในถ้วยอลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว นำไปอบแห้งที่ 105˚C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำหนักภาชนะรวมทั้งตัวอย่างอีกครั้งเพื่อคำนาณเปอร์เซ็นต์วัตถุแห้งดังนี้

$$\text{วัตถุแห้ง (\%)} = \frac{\text{(นน. ตัวอย่างก่อนอบ-นน. ตัวอย่างหลังอบ) x 100}}{\text{นน. ตัวอย่างก่อนอบ}}$$

5. **ปริมาณโปรตีนรวมในอาหารสัตว์** (อังคณา และ ดวงสมร, 2532)

นำตัวอย่างจำนวน 0.5 กรัมใส่ลงใน Digestion tube เติม K_2SO_4 ในอัตราส่วน 1:10 จำนวน 2 g เติม H_2SO_4conc. 15 ml เขย่าเบาๆแล้วนำ Digestion tube ไปย่อยใน Digestor ที่อุณหภูมิ 420˚C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงจนได้สารละลายที่ใส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำไปกลั่นใน Distillation unit โดยใช้สารละลายบอริกเข้มข้น 4% 25 ml เป็นตัวจับไนโตรเจน นำส่วนที่กลั่นได้ไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน HCl 0.1 N จนกระทั่งได้สารละลายสีม่วงอมเทา ทำการวิเคราะห์ควบคู่ไปกับการใช้น้ำกลั่นปริมาตร 1 ml แทนตัวอย่าง (blank) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์โปรตีนดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน} = \frac{\text{(A-B)x 0.014xNx100}}{\text{W}}$$

เมื่อ A = ปริมาตรของสารละลายกรดมาตรฐาน HCl 0.1 N ที่ไตเตรทกับตัวอย่าง

B = ปริมาตรของสารละลายกรดมาตรฐาน HCl 0.1 N ที่ไตเตรท Blank

N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดมาตรฐาน HCl

W = น้ำหนักของตัวอย่าง

โปรตีน (%) = เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน x 6.25

6. **วัตถุแห้งของไซเลจ**

ชั่งตัวอย่างไซเลจประมาณ 5 g ใส่ลงในถ้วยอลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว นำไปอบแห้งที่ 105 ˚C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำหนักภาชนะรวมทั้งตัวอย่างอีกครั้งเพื่อคำนาณเปอร์เซ็นต์วัตถุแห้งดังนี้

$$\text{วัตถุแห้ง (\%)} = \frac{\text{(นน. ตัวอย่างก่อนอบ-นน. ตัวอย่างหลังอบ) x 100}}{\text{นน. ตัวอย่างก่อนอบ}}$$

7. **การวิเคราะห์ปริมาณผนังเซลล์** (อังคณา และ ดวงสมร, 2532)

ชั่งตัวอย่างอาหารที่บดละเอียดจำนวน 1 g ใส่ลงใน Berzelius beaker เติมด้วยสารละลาย Neutral detergent ปริมาณ 100 ml สารละลาย Decahydronaphthalene 2 ml และ Sodium sulfite 0.5 g ต้มให้เดือดภายใน 5-10 min (ต้มแบบ Reflux) แล้วลดความร้อนลงให้สารละลายเดือดเบา ๆ เพื่อป้องกันการเกิดฟอง ต้มให้เดือดต่อไปอีก 60 min จากนั้นนำไปกรองใน sintered glass crucible ที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว ล้างตัวอย่างที่ค้างอยู่ในบีเกอร์ลงใน Crucible ด้วยน้ำร้อน (อุณหภูมิ 90-100 ˚C) โดยใช้น้ำให้น้อยที่สุดเท่าที่จะทำได้ ปิดเครื่องดูดสุญกาศเมื่อดูดน้ำออกจากตัวอย่างหมดแล้ว ล้างเยื่อใยที่กรองได้อีก 2 ครั้งด้วยน้ำร้อน เมื่อดูดน้ำออกจากตัวอย่างจนหมดแล้ว ล้างเยื่อใยด้วย Acetone หรือ Alcohol อีก 2 ครั้ง นำ Sintered glass crucible พร้อมตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 103 ˚C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หรือที่ 100 ˚C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนัก คำนวณเปอร์เซ็นต์ผนังเซลล์ดังนี้

$$\text{ผนังเซลล์ (\% DM)} = \frac{\text{(A-B)}}{\text{S}} \text{ x } 100$$

เมื่อ A = นน. Sintered glass crucible พร้อมตัวอย่างเยื่อใยหลังอบ

B = นน. Sintered glass crucible

S = นน. ตัวอย่างแห้ง

8. **การวิเคราะห์ปริมาณลิกโนเซลลูโลส** (อังคณา และดวงสมร, 2532)

ชั่งตัวอย่างอาหารที่บดละเอียดจำนวน 1g ใส่ลงใน Berzelius beaker เติมด้วยสารละลาย Acid detergent ปริมาณ 100 ml สารละลาย Decahydronaphthalene 2 ml และ Sodium sulfite 0.5 g ต้มให้เดือดภายใน 5-10 min (ต้มแบบ Reflux) แล้วลดความร้อนลงให้สารละลายเดือดเบาๆเพื่อป้องกันการเกิดฟอง ต้มให้เดือดต่อไปอีก 60 min จากนั้นนำไปกรองใน Sintered glass crucible ที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว ล้างตัวอย่างที่ค้างอยู่ในบีเกอร์ลงใน Crucible ด้วยน้ำร้อน (อุณหภูมิ 90-100 ˚C) โดยใช้น้ำให้น้อยที่สุดเท่าที่จะทำได้ ปิดเครื่องดูดสุญกาศเมื่อดูดน้ำออกจากตัวอย่างหมดแล้ว ล้างลิกโนเซลลูโลสที่กรองได้อีก 2 ครั้งด้วยน้ำร้อน เมื่อดูดน้ำออกจากตัวอย่างจนหมดแล้ว ล้างตัวอย่างด้วย Acetone จนกระทั่งไม่มีสีออกมา นำ Sintered glass crucible พร้อมตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 100 ˚C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนัก คำนวณเปอร์เซ็นต์ลิกโนเซลลูโลสดังนี้

$$\text{ลิกโนเซลลูโลส (\% DM)} = \frac{(A-B) \times 100}{S}$$

เมื่อ A = น้ำหนัก Sintered glass crucible พร้อมตัวอย่างลิกโนเซลลูโลสหลังอบ
B = น้ำหนัก Sintered glass crucible
S = น้ำหนักตัวอย่างแห้ง

9. **pH และ BC ใน ไซเลจ** (ดัดแปลงจาก Playne and McDonald, 1966)

นำตัวอย่างไซเลจ 15 g แช่ในน้ำกลั่น 250 ml ตั้งทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิ 4˚C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่กรองได้ไปวัดค่า pH ส่วนค่า BC วิเคราะห์โดยนำสารละลายดังกล่าวไปปรับ pH ให้เหลือ 3 ด้วย 0.1 N HCl จากนั้นไตเตรทด้วย 0.1 N NaOH ให้ได้ pH เท่ากับ 6 นำปริมาตรของ 0.1 N NaOH ที่ใช้ปรับ pH จาก 4-6 ไปคำนวณค่า BC ดังนี้

$$\text{BC (milliequiv. NaOH/100g. DM)} = (100 \times N \times V)/DW$$

เมื่อ N = ความเข้มข้นของ NaOH
V = ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ในการไตเตรทจาก pH 4 -6
DW = น้ำหนักตัวอย่างแห้ง

10. **Water soluble carbohydrate (WSC)**

ชั่งตัวอย่างไซเลจ 10 g แช่ลงในน้ำกลั่น 30 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4˚C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นกรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ผ่านการกรองนี้ไปวิเคราะห์ WSC โดยวิธี phenol-sulfuric (Dubois *et al*., 1956) ดังนี้

ดูดสารละลายตัวอย่าง 1 ml เติมด้วยสารละลาย 5% phenol 1ml เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม H_2SO_4 conc. 5 ml ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 30˚C เป็นเวลา 20 min แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 490 nm นำค่าดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคสที่ความเข้มข้นที่ 0-80 mg/ml เพื่อหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง ดังนี้

$$\text{ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (g/l)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 nm x อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน x 1000}}$$

$$\text{ปริมาณ WSC (\% DM)} = 30X/DW$$

เมื่อ X = ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

DW = น้ำหนักตัวอย่างแห้ง

11. **ปริมาณกรดแลคติกและกรดไขมันที่ระเหยง่าย** (Ohmomo *et al*., 2004)

ชั่งตัวอย่างไซเลจ 10 g แช่ลงในน้ำกลั่น 30 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4˚C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นกรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 และกรองซ้ำอีกครั้งด้วยหัวกรองขนาด 0.2 μm นำสารละลายที่ผ่านการกรองได้ผสมกับกรดTartaricที่มีความเข้มข้น0.2%ในอัตราส่วน1:1โดยปริมาตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์กรดแลคติกและกรดไขมันที่ระเหยง่ายชนิดต่างๆ ได้แก่ กรดอะซิติก กรดโพรปิโอนิค และกรดบิวทีริคโดยใช้เครื่อง HPLC (Thermo Quest Spectra P-100) ใช้คอลัมน์ Sulfonate divinyl benzene styrene HPX-87 (Bio-Rad, diameter 7.8 mm x length 300 mm) ที่ 45˚C ใช้กรดซัลฟิวริคเข้มข้น 0.008 โมล่าร์เป็นวัตภาคเคลื่อนที่ในอัตรา 0.5 ml/min ใช้ UV/VIS photometer (Thermo Quest Spectra UV-150) ความยาวคลื่น 230 nm เป็นDetector คำนวณปริมาณกรดจากสูตรดังนี้

ปริมาณกรด (% DM) = (A/T) x D x 30/(slope x DW)

เมื่อ A = พื้นที่ใต้กราฟของกรดใดๆ

T = พื้นที่ใต้กราฟของกรด Tartaric

D = ความหนาแน่นของกรดใดๆ

DW = น้ำหนักตัวอย่างแห้ง

12. **ปริมาณ NH_3-N ในไซเลจ**

ชั่งตัวอย่างไซเลจ 10 กรัมแช่ในน้ำกลั่น 30 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4˚C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ผ่านการกรองนี้ไปวิเคราะห์ปริมาณ NH_3-N (จีระชัย, 2541) ดังนี้

นำสารละลายตัวอย่างจำนวน 10 µlใส่หลอดทดลอง เติมด้วยสารละลาย A (5 g phenol + 25 g sodium nitropruside เติมด้วยน้ำ deionized ให้ครบ 500 ml) จำนวน 2.5 ml ปิดหลอดทดลองด้วยพาราฟิล์ม แล้วเขย่าแรงๆให้สารละลายเข้ากันได้ดี จากนั้น เติมด้วยสารละลาย B (2.5 g sodium hydroxide + 4.2 ml ของ5% sodium hypochlorite แล้วเติมด้วยน้ำ deionized ให้ครบ 500 ml) จำนวน 2.5 ml เขย่าให้สารละลายเข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 20 min ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 625 nm นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณ NH_3-N โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ จำนวน 4.7171 g ใน Deionized water 100 ml (10 mgN/l) เจือจางด้วย 0.2 %H_2SO_4 ในการทำกราฟมาตรฐาน

ปริมาณ NH_3-N (% total N) = (OD x 30 x 6.25)/(slope x CP x DW x 100)

เมื่อ OD = ค่าการดูดกลืนแสง

CP = โปรตีนรวมของตัวอย่าง

DW = น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง

13. **ปริมาณจุลินทรีย์ในไซเลจ** (Ohmomo et al., 2004)

นำตัวอย่างไซเลจ 10 g มาเติมด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 90 ml นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Stomacher ที่ความเร็ว 60 rpm เป็นเวลา 2 min จากนั้นเจือจางตัวอย่างด้วยเทคนิค Serial dilution

โดยใช้สารละลาย 0.85 % NaCl ไปเปตสารละลายเชื้อที่ได้ 0.1 ml เพื่อการ pour plate ในอาหารเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆสำหรับการนับจำนวนจุลินทรีย์ ดังนี้

- MRS broth agar + 0.6 % $CaCO_3$ สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติก
- Violet red bile agar (Difco, USA) +1% glucose สำหรับเอนเทอโรแบคทีเรีย
- Potato dextrose agar (Scharlau, Spain)+10% tataric acid จำนวน 18 ml/L สำหรับเชื้อยีสต์ และราเส้นใย
- Sufite iron agar สำหรับคลอสตริเดียม (หลังจากทำการ pour plate แล้วเททับด้วย agar)

ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อแล้วนำมาคำนวณดังนี้

จำนวนจุลินทรีย์ (cfu/g silage) = จำนวนโคโลนี x อัตราการเจือจาง

14. **ปริมาณน้ำนมที่ปรับไขมัน 4%** (Schmidt and Vleck, 1974)

ปริมาณน้ำนมที่ปรับไขมัน 4% (4% fat corrected milk; 4% FCM) คำนวณดังนี้

4% FCM = (0.4xปริมาณน้ำนมที่แท้จริง) + (15 ปริมาณไขมันในน้ำนม)