ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การตรวจวิเคราะห์ทางด้านเคมี

1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (รุ่น UL-60 ยี่ห้อ Memmet, Germany)
2. ถ้วยหาความชื้นพร้อมฝาปิด (Moisture can)
3. โถดูดความชื้น (desiccator)
4. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (รุ่น TA4102 ยี่ห้อ Pioneer^{TM}, USA)
5. Tongs หรือ Forceps (รุ่น F6010, USA)

1.2 วิธีการวิเคราะห์

หาน้ำหนักที่คงที่ของถ้วยเปล่า โดนนำเข้าตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง ทำให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักแล้วนำเข้าอบใหม่ดำเนินการเหมือนครั้งแรก จนได้น้ำหนักคงที่และบันทึกค่า (น้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไปไม่มากกว่า 1 มิลลิกรัม)

↓

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่แน่นอนจำนวน 2 กรัม (บันทึกค่า) ใส่ลงในถ้วยที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว เกลี่ยตัวอย่างออกอย่างสม่ำเสมอให้มีเนื้อที่ที่มากที่สุดที่จะทำได้

↓

อบตัวอย่างในถ้วยหาความชื้นให้แห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง ทำให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก แล้วนำตัวอย่างเข้าอบใหม่อีกครั้ง ครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักคงที่ (น้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไปไม่มากกว่า 1 มิลลิกรัม) บันทึกค่าน้ำหนักหลังอบที่แน่นอน

↓

นำผลที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณความชื้นดังสมการต่อไปนี้

1.3 วิธีการคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ(กรัม)}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

ภาพที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น
ที่มา : วิเคราะห์ตามวิธี AOAC (2000)

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

2.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องวิเคราะห์โปรตีน KJELTEC 2200 ยี่ห้อ FOSS
2. หลอดย่อยโปรตีน ขนาด 250 มิลลิลิตร
3. ชุดกลั่นโปรตีน
4. ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1000 มิลลิลิตร
5. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
6. บิวเรตต์ ขนาด 50 มิลลิลิตร
7. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
8. กระดาษชั่งสาร

2.2 สารเคมี

1. กรดซัลฟิวลิกเข้มข้น ถพ. 1.84, N_2-free
2. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$:$5H_2O$)
3. โปตัสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4)
4. สารละลายโซเดียมไฮดรกไซด์ ร้อยละ 40
5. สารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล: HCl มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1 ลิตร
6. สารละลายกรดคาร์บอนิกร้อยละ 4: เตรียมโดยใช้น้ำร้อน
7. Indicator: Methyl red 0.1 กรัม ผสมกับ Bromocresl green 0.1 กรัม ในเอทานอล 100 มิลลิลิตร
8. โซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH)

2.3 วิธีการวิเคราะห์

พับกระดาษชั่งสารเป็นรูปซองจดหมาย ชั่งตัวอย่างลงในกระดาษชั่งสารให้ได้น้ำหนักแน่นอน ประมาณ 1 กรัม

↓

เติมคอปเปอร์ซัลเฟต 0.8 กรัม และ โปตัสเซียมซัลเฟต 7 กรัม

↓

เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 12 มิลลิลิตร และเขย่าเบา ๆ เพื่อให้ท่วมตัวอย่าง (ตัวอย่างที่มีไขมันสูงมากกว่าร้อยละ 10 หรือคาร์โบไฮเดรตสูง ใช้ 15 กรัม)

↓

ใส่หลอดย่อยใน Rack ปิดฝาหลอดย่อยด้วย exhaust system เปิดสวิทช์ชุดจับไอกรด (Scrubber unit) ให้แสดงปุ่ม ◯ เปิดสวิทช์เครื่องย่อย (Digestor) ตั้งอุณหภูมิที่ 420 องศาเซลเซียส

ย่อยจนได้สารละลายสีฟ้าใส ในตู้ดูดควัน (ใช้เวลาประมาณ 30-60 นาที) ยก rack หลอดย่อยขึ้นพักไว้บน stand (ยังไม่ต้องเปิดฝาหลอดย่อย) ทิ้งให้เย็น

นำขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ไปตั้งทิ้งไว้ที่ตำแหนงรองรับของเครื่องกลั่น และเลื่อนฐานขึ้นให้ปลายแท่งแก้วจุ่มอยู่ใต้สารละลาย รองรับสิ่งที่กลั่นได้ด้วยสารละลายกรดบอริกเข้มข้นร้อนละ 4 ปริมาตร 25-30 มิลลิลิตร ที่ผสม indicator ระหว่าง Methyl red 0.1 กรัม ผสมกับ Bromocresl green เรียบร้อยแล้ว

นำหลอดกลั่นใส่ให้ตรงหัวกลั่น เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 80 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปิด safety door เครื่องจะทำงานทันที (ก่อนจะเปิด cooling bath ตั้งอุณหภูมิที่ 10-15 องศาเซลเซียส warm เครื่องกลั่น ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง โดยไม่ต้องเติม NaOH และ Boric acid) และทำเช่นเดียวกันเมื่อเสร็จสิ้นการทดลองทุกครั้ง

กลั่นประมาณ 4 นาที (สารละลายใน flask รองรับจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว) ล้างปลายอุปกรณ์ควบแน่นด้วยน้ำกลั่นลงใน flask รองรับ

ไทรเทรตสารละลายที่กลั่นได้กับสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล จนได้สีชมพู (จุดยุติ) จนปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้

ทำ blank ด้วยวิธีการเดียวกันตั้งแต่แรก

ภาพที่ 4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน
ที่มา : วิเคราะห์ตามวิธี AOAC (2000)

3. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ชุดเครื่องมือและอุปกรณ์เครื่อง Soxtec Avanti 2050 Auto System
2. หลอดบรรจุตัวอย่าง (thimble) พร้อมจับ (thimble holder)
3. ถ้วยสกัด (Extraction cup) พร้อมที่จับ (Extraction cup holder)
4. โกรงบดสาร
5. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
6. โถดูดความชื้น (desiccator)

3.2 สารเคมี

เฮกเซน (จุดเดือด 62-67 องศาเซลเซียส หรือ ปิโตเลียมอีเทอร์ จุดเดือด 40-60 องศาเซลเซียส)

3.3 วิธีการวิเคราะห์

เปิดเครื่องทำน้ำเย็น (Cooling bath) ควบคุมอุณหภูมิที่ 12-15 องศาเซลเซียส

↓

Warm เครื่อง Soxtec โดยเปิดปุ่ม power ปรับอุณหภูมิและตั้งโปรแกรมการทำงานตามชนิดของ ตัวทำละลายที่ใช้

ถ้าใช้ Hexane (over temp. = 210 ^{O}C, hot plate = 155^{O}C, boiling time = 45 min, rinse = 15 min, recovery = 15 min, pre-drying = 30 min)

ถ้าใช้ Petroleum (over temp. = 210 ^{O}C, hot plate = 135^{O}C, boiling time = 45 min, rinse = 15 min, recovery = 15 min, pre-drying = 30 min)

↓

Pre-heat hot plate โดยกดปุ่ม ccc

↓

ชั่งตัวอย่างอาหารที่อบแห้งและบดละเอียดแล้ว 1 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ใน thimble (ตัวอย่างที่มีความชื้น นำไปอบให้แห้งใน hot air oven ที่ 110 องศาเซลเซียส, 20 นาที)

↓

นำ Thimble มาใส่ในตัวเครื่อง Soxtec ด้วย thimble holder

↓

เติมตัวทำละลายประมาณ 50 มิลลิลิตร ใน extraction cup ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน (ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส, 2 ชั่วโมง) นำไปต่อเข้ากับ condenser

↓

กดปุ่ม start 1 ครั้ง โดยโปรแกรมจะเริ่มทำงานตั้งแต่ขั้นตอน boiling จนถึงขั้นตอน pre-drying

↓

เมื่อครบเวลาการทำงานนำ Extraction cup อบใน hot air oven ที่อุณภูมิ 100 ± 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จนมีน้ำหนักคงที่

↓

ระบายตัวทำละลายออกจากเครื่อง ใส่ในขวดตัวทำละลายที่ใช้แล้ว (used)

↓

คำนวณหาปริมาณไขมันที่สกัดได้

3.4 วิธีการคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมันของตัวอย่าง (ร้อยละ)} = \frac{100(w_1-w_2)}{W}$$

w_1= น้ำหนักของ extraction cup และน้ำหนักไขมันที่สกัดได้ภายหลังการอบแห้งแล้ว (กรัม)
w_2 = น้ำหนักของ extraction cup ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (กรัม)
W = น้ำหนักของตัวอย่างอาหาร (กรัม)

ภาพที่ 5 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน
ที่มา : วิเคราะห์ตามวิธี AOAC (2000)

4. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

4.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. Crucible or Porcelain dish (ถ้วยกระเบื้องเคลือบ)
2. Desiccator
3. Electric muffle Furnace
4. Electric burner
5. Hot air oven
6. Tong

4.2 วิธีการวิเคราะห์

อบ Crucible ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของ Crucible

↓

ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของตัวอย่างประมาณ 4-6 กรัม ใส่ Crucible แล้วนำไปเผาไฟอ่อน ๆ บน Electric burner จนหมดควัน

↓

นำตัวอย่างไปเผาในเตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 550±20 องศาเซลเซียส นานประมาณ 2-3 ชั่วโมง จนกระทั่งได้เถ้าสีขาวหรือเทา (ถ้ายังเป็นสีดำให้นำออกมาหยดน้ำกลั่นลงไปให้ท่วมแล้วเผาต่อจนกระทั่งได้เถ้าสีขาว)

↓

นำออกมาลดอุณหภูมิใน Hot air oven ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาใส่ใน desiccator ทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้องแล้วนำไปชั่ง เผาตัวอย่างซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 1 มิลลิกรัม

4.3 วิธีการคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้าร้อยละของตัวอย่าง} = \frac{(W_2\text{-}W)}{(W_1\text{-}W)} \times 100$$

W_1= น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบและตัวอย่างก่อนเผา (กรัม)
W_2 = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบและตัวอย่างหลังจากเผาจนได้น้ำหนักคงที่ (กรัม)
W = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ (กรัม)

ภาพที่ 6 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า
ที่มา : วิเคราะห์ตามวิธี AOAC (2000)

ภาคผนวก ข

การตรวจวิเคราะห์ทางด้านกายภาพ

การตรวจวิเคราะห์ทางกายภาพเนื้อสัมผัสด้วยเครื่อง (Texture analyzer)

ภาพที่ ข-1 เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture analyzer)

การทดสอบด้านเนื้อสัมผัสของขนมปังด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture analyzer) โดยกำหนดสภาวะในการวัดดังนี้

Mode	**: Measure Force in Compression**
Option	**: T.P.A**
Pre – Test Speed	**: 2.0 mm/s**
Teat Speed	**: 5.0 mm/s**
Post - Test Speed	**: 5.0 mm/s**
Distance	**: 4.0 %**
Force	**: 100 g**
Time	**: 5.0 sec.**
Trigger Type	**: Auto 20 g**
Probe Type	**: P100**

การตรวจวิเคราะห์ทางด้านกายภาพเครื่องวัดค่าสี (Handy colorimeter NR-3000, Japan)

การวิเคราะห์ค่าสีโดยระบบสีของฮันเตอร์ (Hunter) ระบบสีของฮันเตอร์จะประกอบด้วย ตัวแปรของสี 3 ตัว คือ L a b ซึ่งมีความหมายดังนี้

L คือ ค่าความแตกต่างของสี ซึ่งมีค่าจาก 0 คือ สีดำ ถึง 100 คือ สีขาว

a คือ ค่าที่บ่งบอกความเป็นสีเขียวและสีแดงที่อยู่ในตัวอย่าง โดย ค่า a+ แสดงถึงค่าความเป็นสีแดง และค่า a- แสดงค่าความเป็นสีเขียว

b คือ ค่าที่บ่งบอกความเป็นสีเหลืองและสีน้ำเงินที่อยู่ในตัวอย่าง โดย ค่า b+ แสดงถึงค่าความเป็นสีเหลือง และค่า b- แสดงค่าความเป็นสีน้ำเงิน

1. อุปกรณ์

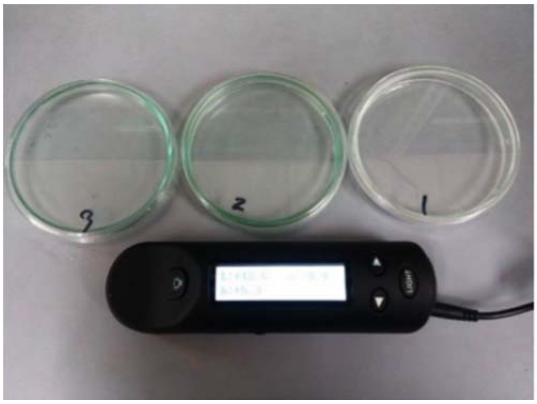
1.1 เครื่องวัดค่าสี (Handy colorimeter NR-3000, Japan)

2. การวิเคราะห์

2.1 นำตัวอย่างใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อ

2.2 นำเครื่อง Handy colorimeter วางบนจานเลี้ยงเชื้อกดปุ่มด้านหลัง 1 ครั้ง

2.3 บันทึกผล



ภาพที่ ข-2 เครื่องวัดค่าสี (Handy colorimeter NR-3000, Japan)

ภาคผนวก ค

การตรวจวิเคราะห์ทางด้านจุลชีววิทยา

1. วิธีการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) (ดัดแปลงจาก BAM online, 2001)

ชั่งตัวอย่างน้ำหนัก 50 กรัม ใส่ลงในถุง stomacher เติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 450 มิลลิลิตร นำไปตีผสมเป็นเวลานาน 60 วินาที ในเครื่องตีผสม (Stomacher) ทำการเจือจางตัวอย่างจนถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-5} นำสารละลายระดับความเจือจางที่ 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} และที่10^{-5} มาถ่ายลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 2 จาน ๆ ละ 1 มิลลิลิตร เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA หลอมเหลว อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่างจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการหมุนจาน รอจนวุ้นแข็งตัว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง (ควั่ำจาน) นับโคโลนีที่ได้จากแต่ละจานเพาะเชื้อหาค่าเฉลี่ย และคำนวณค่า cfu ต่อกรัมของตัวอย่าง และค่า log cfu /g

2. วิธีการวิเคราะห์จำนวนยีสต์ รา(Yeast&Mold) (ดัดแปลงจาก BAM online, 2001)

ชั่งตัวอย่างน้ำหนัก 50 กรัม ใส่ลงในถุง stomacher เติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 450 มิลลิลิตร นำไปตีผสมเป็นเวลานาน 60 วินาที ในเครื่องตีผสม (Stomacher) ทำการเจือจางตัวอย่างจนถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-3} นำสารละลายระดับความเจือจางที่ 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} มาถ่ายลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 2 จาน ๆ ละ 1 มิลลิลิตร เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลอมเหลว อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่างจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการหมุนจาน รอจนวุ้นแข็งตัว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน นับโคโลนีที่ได้จากแต่ละจานเพาะเชื้อหาค่าเฉลี่ย และคำนวณค่า cfu ต่อกรัมของตัวอย่าง และค่า log cfu /g

3. วิธีการวิเคราะห์ *B.cereus* (ดัดแปลงจาก BAM online, 2001)

นำตัวอย่าง 50 กรัม เติม 0.1% sterile peptone water ปริมาตร 450 มิลลิลิตร นำไปตีด้วย stomacher นาน 1 นาที นำตัวอย่างที่ตีป่นแล้ว (ความเจือจาง 10^{-1}) มาเจือจางต่อด้วย 0.1% sterile peptone water นำตัวอย่างที่เจือจางแล้ว (0.1 ml) มาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol egg polymyxin agar (MYP,Merck) บ่มจานเพาะเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นจำนวนโคโลนีของ *B.cereus* ที่เกิดขึ้น หาค่าเฉลี่ย และคำนวณค่า cfu/g

4.การนับจำนวนแบคทีเรียที่ผิวไส้กรอก

นับจำนวนแบคทีเรียที่ผิวไส้กรอกโดยวิธี conventional plate count ด้วยเทคนิค spread plate ตามวิธีของ Bacteriological Analytical Manual (BAM) online Chapter 3 โดยนำไส้กรอกมาตีเอาแบคทีเรียที่ผิวไส้กรอกด้วยเครื่อง stomacher (08030 Barcelona, IUL instrument, Sapain) นาน 2 นาที จากนั้นนำสารละลายแบคทีเรียที่ได้ไปทำการเจือจางด้วยสารละลาย NSS ที่ความเจือจาง 10^{-1} – 10^{-6} และนำค่าความเจือจางที่เหมาะสมไปเพาะลงบนอาหารแข็ง (tryptic soy agar, TSA) ด้วยเทคนิค spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 35±2 $^{\circ}$C นาน 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนแบคทีเรียในช่วง 25-250 โคโลนี เพื่อคำนวณค่า CFU/g

ประวัติผู้วิจัย

ดร.มณชัย เดชสังกรานนท์ เกิดเมื่อวันที่ 25 ธันวาคม 2520 ณ โรงพยาบาลศูนย์จังหวัดนครปฐม สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาเอก สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จากคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มีประสบการณ์ทำงานเป็นผู้ช่วยนักวิจัย ณ สถาบันวิจัยไวน์และสุราพื้นบ้าน คณะวิศวกรรมและเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ตั้งแต่ มิถุนายน 2546-พฤษภาคม 2547 ปัจจุบันเป็นอาจารย์สังกัดคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต ตั้งแต่ มิถุนายน 2547-ปัจจุบัน ในระหว่างการเป็นอาจารย์ ได้รับรางวัลนักวิจัยดีเด่น เครือข่ายวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏภาคกลางกลุ่มรัตนโกสินทร์ สาขาวิชาการที่มีความสนใจ ได้แก่ เทคโนโลยีชีวภาพ เทคโนโลยีการหมัก เทคโนโลยีเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย และจุลินทรีย์เพื่อสุขภาพและความงาม