ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.
อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. Yeast extract malt extract agar (YM agar)

องค์ประกอบ

glucose	10 กรัม
peptone	5 กรัม
malt extract	3 กรัม
yeast extract	3 กรัม
agar	15 กรัม

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

2. Yeast extract malt extract broth (YM broth)

มีส่วนผสมเช่นเดียวกับ YM agar แต่ไม่มีการเติม agar ลงไป ส่วนวิธีการเตรียมก็เช่นเดียวกับ YM Agar

3. Production medium

องค์ประกอบ

peptone	5 กรัม
malt extract	3 กรัม
yeast extract	3 กรัม
แป้งมันสำปะหลัง	40 กรัม

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 5.5 ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Starch agar

องค์ประกอบ

peptone	2 กรัม
yeast extract	1 กรัม
soluble starch	1 กรัม
agar	~~1.5~~ 15 กรัม

วิธีการเตรียม

เช่นเดียวกับวิธีการเตรียม YM agar

ภาคผนวก ข.
สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

1. Phosphate buffer

เตรียมได้โดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตาม pH ที่ต้องการ

สารละลาย A : 0.2 M monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$ 31.2 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.2 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.7H_2O$ หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 53.65 กรัม หรือ 74.7 กรัม ตามลำดับ ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	pH
93.5	6.5	5.7
92.0	8.0	5.8
90.0	10.0	5.9
87.7	12.3	6.0
85.0	15.0	6.1
81.5	18.5	6.2
77.5	22.5	6.3
73.5	26.5	6.4
68.5	31.5	6.5
62.5	37.5	6.6
56.5	43.5	6.7
51.0	49.0	6.8
45.0	55.0	6.9
39.0	61.0	7.0
33.0	67.0	7.1
28.0	72.0	7.2
23.0	77.0	7.3
19.0	81.0	7.4
16.0	84.0	7.5

2. การวัดการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี Microscopic count

การตรวจนับจำนวนเซลล์ โดยใช้ haemacytometer (Petreoff-hausser chamber) haemacytometer เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับนับเม็ดเลือดแต่ได้นำมาประยุกต์ใช้ในการนับจำนวนจุลินทรีย์และสปอร์ของรา เครื่องมือนี้เป็นสไลด์มีช่องแบ่งไว้แน่นอน และมีขอบยกสูงจากบริเวณขีด เมื่อปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ขอบนี้จะรองรับกระจกปิดสไลด์ไว้ ทำให้เกิดระยะห่างจากกระจกสไลด์ ในบริเวณที่ขีดคิดเป็นความลึกได้ 0.1 หรือ 0.2 มิลลิลิตร แล้วแต่บริษัทผู้ผลิต ขีดแบ่งที่กำหนดไว้ประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 25 ช่อง แต่ละช่องมีขนาด 0.2 x 0.2 ตารางมิลลิเมตร ดังนั้นของเหลวที่บรรจุอยู่ในแต่ละช่องเล็กจะมีปริมาตร 0.00025 (0.05 x 0.05 x 0.1) ลูกบาศก์มิลลิเมตร เครื่องมือนี้จะมีกระจกปิดสไลด์ซึ่งมีขนาดและความหนาเฉพาะไม่ควรใช้กระจกปิดสไลด์อื่นแทนเนื่องจากน้ำหนักของกระจกจะมีผลทำให้ปริมาตรภายในช่องระหว่างสไลด์กับกระจกผิดไปได้ และเมื่อใช้กระจกที่หนาไปจะเป็นอุปสรรคต่อการโฟกัสกล้อง

ข้อกำหนดของความถูกต้องแม่นยำ

ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ควรเจือจางให้อยู่ในระดับที่สามารถตรวจนับจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็กได้ในระหว่าง 1 – 10 เซลล์

การตรวจนับ

1. ล้างเครื่องมือให้สะอาดเช็ดให้แห้ง
2. ปิดทับบริเวณสี่เหลี่ยม ซึ่งมีช่องแบ่งด้วยกระจกปิดสไลด์
3. ใช้ปิเปตแบบซึ่งใช้เฉพาะกับเครื่องมือนี้ได้มีสายยางสวมปลาย ที่จะใช้ดูดตัวอย่างอาหาร และปลายปิเปตด้านแหลมที่มีช่องระหว่างสไลด์และกระจกปิดสไลด์เป่าให้ตัวอย่างซึมเข้าไปในบริเวณช่องซึ่งกำหนดปริมาตรดังที่กล่าวไว้ข้างต้น
4. ตรวจนับโดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 40 เท่า
5. นับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็ก ควรตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งสิ้นไม่น้อยกว่า 10 ช่อง

การคำนวณปริมาณจุลินทรีย์

รวมจำนวนที่นับจากแต่ละช่องเล็กหารด้วยจำนวนช่อง จะได้ค่าเฉลี่ยของจำนวนจุลินทรีย์ต่อหนึ่งช่องเล็ก เช่น ได้ X เซลล์ต่อช่อง

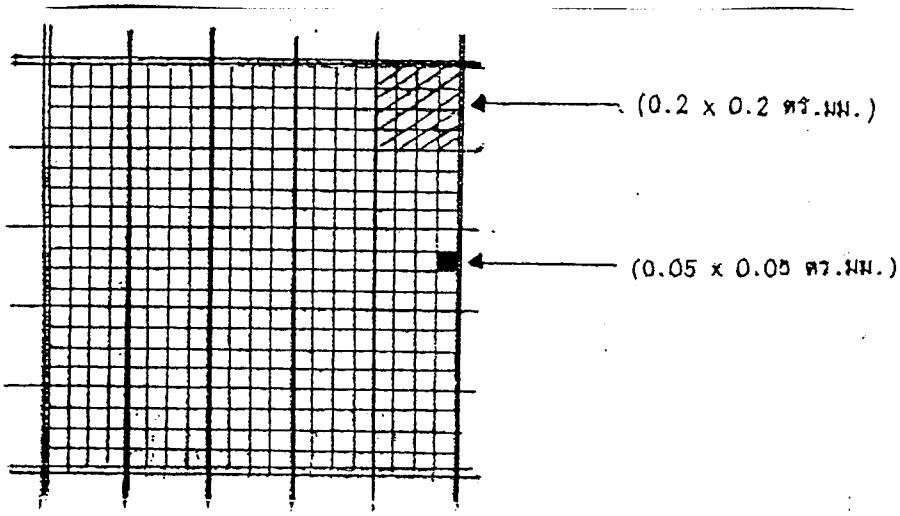
คำนวณจำนวนจุลินทรีย์ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ได้ดังนี้

ตัวอย่าง 0.00025 ลูกบาศก์มิลลิเมตรมีจุลินทรีย์ = X เซลล์

(ปริมาตรของแต่ละช่องเล็ก)

ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร $= \frac{X \times 10^3}{0.00025}$ เซลล์

$= X \times 4 \times (10^6)$ เซลล์



รูปที่ ข.1 ตัวอย่างช่องสี่เหลี่ยมภายในสไลด์

3. การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

1) อบกระดาษอลูมิเนียมฟอยด์ที่พับเป็นกระทงที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำไปทำให้เย็นใน desicator แล้วนำมาชั่งน้ำหนักโดยละเอียด

2) ปิเปตสารละลายของเชื้อลงบนกระทงกระดาษอลูมิเนียมฟอยด์ 5 มิลลิลิตร

3) นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส จนแห้งนำไปทำให้เย็นใน desicator แล้วนำมาชั่งน้ำหนักจนน้ำหนักคงที่โดยใช้เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

4) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น คือ น้ำหนักของเซลล์จุลินทรีย์ต่ออาหาร 5 มิลลิลิตร

4. การหาปริมาณแป้ง โดยวิธี Iodine method

สารเคมี

1. Starch standard. (stock)

ก) Na_2HPO_4 1.33 กรัม

Benzoic 0.43 กรัม

น้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร

นำไปต้มพร้อมกับผสมจนละลายในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิกรัม

ข) ละลายแป้ง (soluble starch, AR grade) 0.1 กรัมใส่ใน Beaker ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำเย็นประมาณ 5 มิลลิลิตร

ค) เทสารละลาย (ข) ใส่ (ก) ขณะที่สาร (ก) กำลังเดือด ผสมจนละลาย ทิ้งไว้ให้เย็นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น (เข้มข้น 0.1 กรัม/100 มิลลิลิตร หรือ 1 กรัม/ลิตร)

2. สารละลายแป้งมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25 และ 0.125 กรัม/ลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเจือจาง

3. Stock iodine solution 0.1 โมล/ลิตร

KIO_3 (Potassium Periodate)	0.3567 กรัม
KI (Potassium iodide)	4.5 กรัม

ละลายสารด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตร หลังจากนั้นค่อย ๆ เติมกรด HCl เข้มข้น 0.9 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

4. Working iodine solution :

ใช้ Stock ข้อ 3) 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

วิธีทำ

Starch standard หรือ Sample	1 มิลลิลิตร
H_2O	4 มิลลิลิตร
Working iodine	1 มิลลิลิตร
เติมน้ำจนครบ	50 มิลลิลิตร

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ปริมาณแป้งคิดเป็นหน่วย กรัม/ลิตร

5. การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing sugar) โดยวิธี 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS)

วิธีการนี้สามารถใช้ตรวจหาปริมาณน้ำตาลพวก Reducing sugar ในช่วงระหว่าง 5-500 ไมโครกรัม (Glucose equivalent)

วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- 2 N NaOH ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ชั่ง 4 กรัม ของ NaOH ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร)

- DNS solution เตรียมโดยละลาย 3, 5 Dinitrosalicylic acid (DNS) 2.5 กรัม ในสารละลาย 2 N NaOH ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติม Sodium potassium tartrate (Rochelle salt) 75 กรัม คนจนละลายหมด แล้วเติมน้ำให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

1. ดูดสารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลจำนวน 0.1 – 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง สำหรับหลอดควบคุมใช้น้ำหรือบัฟเฟอร์แทนสามารถทำได้ครั้งละหลายตัวอย่าง

2. เติมสารละลาย DNS 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3. ต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที ในระหว่างต้มควรใช้ลูกแก้ววางบนปากหลอดทดลองเพื่อลดการระเหยของน้ำ ลูกแก้วควรมีขนาดใหญ่กว่าปากหลอดพอสมควร เพื่อกันไม่ให้ลูกแก้วตกลงในหลอดทดลอง (ลูกแก้วที่จะนำมาใช้ได้ในการทดลองเป็นชนิดเดียวกับที่เด็ก ๆ ใช้เล่นกันได้)

4. ทำให้เย็นโดยรวดเร็ว โดยการนำหลอดทดลองมาแช่ในน้ำแข็งที่ละลายหรือใส่ในอ่างน้ำที่เปิดให้น้ำไหลตลอดเวลา

5. เติมน้ำ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (OD_{520}) และนำค่า OD ที่วัดได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

6. การหาปริมาณโปรตีนรวม (crude protein) โดยวิธีเจลดาห์ล (Kjeldahl method)

สารเคมี

1. Conc. H_2SO_4 (reagent grade)
2. K_2SO_4 (or anhydrous Na_2SO_4)
3. $CuSO_4 . 5H_2O$ (analyticals grade)
4. 40 % NaOH
5. 4 % Boric acid
6. Standard 0.1 N HCl
7. Indicator

- 0.625 กรัม methyl red, 0.480 กรัม methylene blue ใน 500 มิลลิลิตรของ 95 % ethyl alcohol หรือ 0.1 % methyl red ใน alcohol 1 ส่วนผสมกับ 0.1 % bromocresol green ใน alcohol 5 ส่วน

เครื่องแก้ว

1. Kjeldahl flask ขนาด 500-800 มิลลิลิตร
2. ชุดกลั่นไนโตรเจน รุ่น 7512 ของบริษัท Gerardt, Gerhany
3. ชุดย่อย รุ่น TUR/K ของบริษัท Gerhardt.

วิธีทำ แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. การย่อยสลาย (Digestion)

1.1 ชั่งตัวอย่างประมาณ 0.7-2.2 กรัม ใส่ใน Kjeldahl flask

1.2 เติม $CuSO_4.5H_2O$ 0.5 กรัม และ K_2SO_4 10 กรัม

1.3 เติม Conc. H_2SO_4 25 มิลลิลิตร (ถ้าชั่งตัวอย่างมากกว่า 2.2 กรัม ให้เพิ่ม Conc. H_2SO_4 10 มิลลิลิตร ทุก 1 กรัมที่เพิ่มขึ้น)

1.4 นำ Kjeldahl flask ไปตั้งบนเตาย่อย เริ่มจากไฟอ่อน ๆ ก่อน รอจนควันจางจึงใช้ไฟแรงย่อยจนได้สารละลายใส (อาจจะย่อยต่ออีก 1 ชั่วโมง เพื่อให้แน่ใจว่าปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้ว และถ้าที่คอของ Kjeldahl flask มีจุดดำ ๆ ให้ทิ้ง Kjeldahl flask จนเย็น ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วย่อยต่อไปใหม่)

2. การกลั่น (Distillation)

2.1 นำตัวอย่างที่ย่อยเสร็จ ทิ้งให้เย็นแล้วเติมน้ำ 200 มิลลิลิตร

2.2 เติม pummice stone (กัน bumping)

2.3 ต่อ Kjeldahl flask เข้าเครื่องกลั่น ให้ปลายด้านหนึ่งของ condenser จุ่มใน 4 % boric acid ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2.4 เติม 40 % NaOH ลงใน Kjeldahl flask 70-100 มิลลิลิตร

2.5 กลั่นจนได้แอมโมเนียมออกมาประมาณ 150 มิลลิลิตร เก็บใน boric acid

3. การไตเตรท (Titration)

3.1 นำตัวอย่างที่กลั่นได้มาไตเตรทกับ standard 0.1 N HCl โดยใช้ indicator ที่เหมาะสม

* ตรวจสอบค่า blank โดยทำเช่นเดียวกัน แต่ไม่มีตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(S - B)}{W} \times N \times 0.014 \times 100$$

S = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของ HCl ที่ใช้ในการไตเตรทสารตัวอย่าง

B = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของ HCl ที่ใช้ในการไตเตรท blank

N = นอร์มอลลิตี้ของสารละลายมาตรฐาน HCl

W = น้ำหนักของสารตัวอย่าง (กรัม)

% โปรตีน = % ไนโตรเจน x Factor (ดูในตารางที่ ข.1)

แหล่งโปรตีน	ค่า factor
นมและผลิตภัณฑ์นม	6.38
แป้งสาลี	5.70
ข้าวบาเล่ย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวไรน์	5.83
ข้าวเจ้า	5.95
ถั่วลิสง	5.46
ถั่วเหลือง	5.71
ไข่	6.65
เจลาติน	5.55
เนื้อสัตว์	6.25

7. การหาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (True protein) โดยวิธีลาวรี่ (Lowry method)

วิธีนี้ประยุกต์มาจากวิธีไบยูเรท โดยที่เริ่มแรกจะใช้สารละลายคอปเปอร์ไปทำปฏิกิริยากับโปรตีนภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง จากนั้นเติมสารละลาย Folin-C (Phosphomolybdic-phosphotungstic mixed acid) ลงไป กรดนี้จะไปรีดิวซ์คอปเปอร์คอมเพล็กซ์ให้เป็นสารละลายสีน้ำเงินเข้มปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมที่จะใช้หาปริมาณคือระหว่าง 0.1 – 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งทำให้วิธีนี้มีความไวมากกว่าวิธีของไบยูเรท

วัสดุและสารเคมี

- สารละลาย A : 1 % (w/v) คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)
- สารละลาย B : 2 % (w/v) โซเดียมโปแตสเซียม ทาร์เทรต ($NaKC_4H_4O_6$)
- สารละลาย C : 0.2 M โซเดียม ไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- สารละลาย D : 4 % (w/v) โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)

สารละลายเหล่านี้เก็บที่อุณหภูมิห้องได้

- Folin-Ciocalteau reagent

วิธีการ

1. เตรียมสารละลาย E โดยผสมสารละลาย C 49 มิลลิลิตร กับสารละลาย D 49 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย A 1 มิลลิลิตร จากนั้นจึงใส่สารละลาย B 1 มิลลิลิตร (สารละลาย E ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อน ทำการทดลอง)

2. เจือจาง Folin-Ciocalteau reagent ในอัตราส่วน 1:1 ด้วยน้ำกลั่นเรียกว่า สารละลาย F

3. ใช้สารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน (โดยมีค่าโปรตีนไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัม) 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย E 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้นาน 10 นาที

4. ใส่สารละลาย F 0.25 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดใน ข้อ 3

5. เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที

6. วัดค่าที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้ Sample buffer เป็น blank ทำตามขั้นตอน 3-6

7. เตรียม Standard curve โดยใช้ BSA ความเข้มข้นระหว่าง 0.05 – 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

8. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Crude Fat) โดยวิธี Soxtlet Extraction

หลักการ

การวิเคราะห์หาปริมาณไขมันสามารถใช้สารเคมี เช่น diethyl ether, petroleum ether หรือ dichloromethane ในการสกัด นอกจากไขมันที่สกัดได้แล้วยังมี pigment, organic acid , wax, terine, phospholipids และ alkaloid เป็นต้น บางกรณีไขมันที่มีอยู่ก็สกัดได้ไม่หมดทีเดียว เช่น นมผง ยีสต์แห้ง หรือกระดูกป่น ซึ่งกรณีนี้ควรทำการสกัดไขมันด้วยกรดเกลือก่อน

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องสกัดไขมัน (soxhlet extraction apparatus)
2. fat extraction thimble
3. เตาอบ
4. hot plate
5. desiccator

สารเคมี

1. petroleum ether

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่าง 5 – 10 กรัม ใส่ในหลอด extraction thimble อุดปลายหลอดด้วยสำลี ใส่ลงในเครื่องมือส่วนที่มีลักษณะเป็นหลอดของ soxhlet extraction apparatus ที่อยู่ใต้ condensor

2. ชั่งน้ำหนักขวดก้นกลมที่มี glass bead อยู่ 2 – 3 เม็ด ซึ่งได้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3. เติม petroleum ether ลงในขวดก้นกลม $\frac{3}{4}$ ของขวดก้นกลม แล้วต่อเข้ากับชุด soxhlet extraction apparatus จากนั้นเปิดเตาให้ความร้อนโดยกะประมาณให้ petroleum ether จากขวดก้นกลมระเหย และไหลกลับลงในขวดได้ 15 รอบต่อชั่วโมง ใช้เวลาประมาณ 6 – 8 ชั่วโมง หรือดูจนกระทั่งไขมันถูกชะจากขวด thimble ลงในขวดก้นกลมจนหมด โดยสังเกตุจากสารละลายที่ไหลออกจาก thimble ไม่มีสี

4. เอา thimble ออกจากหลอด แล้วกลั่นต่อไปจน petroleum ether กลับขึ้นมาอยู่ในหลอดจนเกือบหมด แล้วเท petroleum ether เก็บใส่ขวดไว้ใช้ในครั้งต่อไป

5. ตั้งขวดทิ้งไว้ 1 คืน แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นใน dessicator ชั่งน้ำหนักขวดก้นกลมอีกครั้ง

6. นำค่าที่ได้ทั้งหมดมาคำนวณตามสูตร

ปริมาณไขมันและน้ำมัน (%) = $\frac{(B - A)}{C} \times 100$

A = น้ำหนักขวดก้นกลมในข้อ 2 (กรัม)

B = น้ำหนักขวดก้นกลม + น้ำหนักไขมันที่สกัดได้ (กรัม)

C = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

9. การหาปริมาณกรดไขมัน

เครื่องมือ

1. Gas chromatography
2. Vortex Mixer

สารเคมี

1. 5 % HCl ใน CH_3OH
2. Internal Standard (IS, C17:0 Heptadecanoic acid) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ Petroleum ether เป็นตัวทำลาย
3. Hexane

วิธีการ (การทำ tran - methylation)

1. ชั่งสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 100 มิลลิกรัม ลงในขวดไวแอล (vial) ใส่แท่งแม่เหล็ก (magnetic bar)
2. เติม 5 % HCl ใน CH_3OH 2 มิลลิลิตร และ IS. 100 ไมโครลิตร
3. นำไปให้ความร้อนในที่มืดประมาณ 1 ชั่วโมง
4. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติม double distilled water (D.D.W.) 1 มิลลิลิตร และ hexane 1 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา
5. เขย่าให้ผสมกันโดยใช้ vortex mixer
6. ดูดชั้น hexane มาผ่านลงไปใน pasteur pipette ที่มีสำลีและ $NaSO_4$ anhydrous นำส่วนที่กรองได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันโดยใช้แก๊สโครมาโตรกราฟฟี

สภาวะที่ใช้ในแก๊สโครมาโตกราฟฟี

แก๊สโครมาโตกราฟฟีรุ่น 9A ของ Shimadsu ใช้คอลัมน์ 15% DEGS ยาว 3 เมตร อุณหภูมิของคอลัมน์ (column temperature) 190 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของตัวตรวจสอบ (detector temperature) และอุณหภูมิของการฉีด (injection temperature) 220 องศาเซลเซียส แก๊สพาหะ (carrier gas) คือ แก๊สไนโตรเจน (O_2-free Nitrogen) อัตรา 45-70 มิลลิลิตรต่อนาที

10. การหาปริมาณความชื้น

เครื่องมือ

1. เครื่องชั่งสารละเอียด

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างสารที่ต้องการวิเคราะห์ใส่ถ้วยอลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว
2. นำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ทิ้งให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนักอีกครั้ง

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (\% โดยน้ำหนัก)} = \frac{(\text{น้ำหนักสารก่อนอบ} - \text{น้ำหนักสารหลังอบ})}{\text{น้ำหนักสารก่อนอบ}} \times 100$$

11. การหาปริมาณเถ้า

เครื่องมือ

1. เตาเผา
2. เตาอบ
3. โถดูดความชื้น
4. ถ้วยกระเบื้อง
5. เครื่องชั่งละเอียด

วิธีการ

1. นำถ้วยกระเบื้องไปอบในเตาอบที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก

2. ชั่งสารตัวอย่างที่บดละเอียดแล้ว 1 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้อง นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 580 $\pm$ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3. นำถ้วยกระเบื้องออกมาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นแล้วนำไปชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (\% โดยน้ำหนัก)} = \frac{(C - A)}{D} \times 100$$

โดย A = น้ำหนักถ้วยกระเบื้อง (กรัม)

B = น้ำหนักถ้วยกระเบื้อง + น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา (กรัม)

C = น้ำหนักถ้วยกระเบื้อง + น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา (กรัม)

D = น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา = B – A (กรัม)

ภาคผนวก ค.
สูตรอาหารและองค์ประกอบทางเคมี ของสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงนกกระทาไข่

ตารางที่ ค. 1 วัตถุดิบในสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงนกกระทาไข่

วัตถุดิบอาหารสัตว์	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)			
	T1	T2	T3	T4
ข้าวโพด	52	52	52	52
รำละเอียด	5	5	5	5
กากถั่วเหลือง	21	17	13	9
ปลาป่น	10	10	10	10
ใบกระถินป่น	3	3	3	3
ไดแคลเซียมฟอสเฟต	2	2	2	2
เปลือกหอยป่น	4.7	4.7	4.7	4.7
เกลือ	0.3	0.3	0.3	0.3
พรีมิกซ์ (วิตามิน + แร่ธาตุ)	0.6	0.6	0.6	0.6
น้ำมันพืช	1.4	1.4	1.4	1.4
โปรตีนเซลล์เดียว	0	4	8	12
% โปรตีน	20.07	19.94	19.80	19.68

ตารางที่ ค. 2 องค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหารแต่ละสูตร

กลุ่มทดลอง	ความชื้น (%)	เถ้า (%)	โปรตีน (%)	เยื่อใย (%)	ไขมัน (%)	แคลเซียม (%)	ฟอสฟอรัส (%)	พลังงาน (Kcal/g)
1	8.26	12.37	22.13	4.15	6.04	2.83	0.88	3.76
2	7.99	12.16	22.50	3.90	5.64	2.80	0.82	3.69
3	7.68	12.68	23.12	4.73	5.86	2.81	0.90	4.13
4	7.58	12.12	22.60	3.62	5.58	2.89	0.93	4.02

ภาคผนวก ง.
การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้วิธีการวิเคราะห์ตามทฤษฎี Cochran's Theorem (Montgomery D.C. 1984)

$$F_o = \frac{SS_{treatment} / (a-1)}{SS_E / (N-a)} = \frac{MS_{treatment}}{MS_E}$$

ถ้ากำหนดให้

$H_o = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \ldots \mu_n$

$H_1 = \mu_1, \mu_2, \mu_3, \ldots \mu_n$ ไม่เท่ากันอย่างน้อย 1 คู่

จะปฏิเสธสมมติฐาน H_o เมื่อ

$$F_o > F_{\alpha, a-1, N-a}$$

จะยอมรับสมมติฐาน H_o เมื่อ

$$F_o < F_{\alpha, a-1, N-a}$$

<u>ตารางที่ ง. 1</u> ตัวอย่างการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การไข่

กลุ่มทดลอง	สัปดาห์ที่					
	1	2	3	4	Xi	Xi
1	26.19	57.14	59.52	75.00	217.84	54.46
2	42.86	80.95	92.86	91.67	308.34	77.09
3	28.57	45.24	64.29	86.11	244.21	56.05
4	35.71	66.67	66.67	90.00	259.05	64.76

X.. = 109.11 X.. = 63.09

SS_T = 7525.23

SS_{Tr} = 1290.64

SS_E = 6234.59

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การไข่

Source of Variation	Sum of Square	Degree of Freedom	Mean of Square	Fo
Treatment	SS_T	3	430.21	1.10
Error	SS_{Tr}	12	389.66	
Total	SS_E	15		

$F_0 = 1.10$

$F_{0.05,3,12} = 3.49$

สมมติฐานเชิงสถิติที่ต้องการทดสอบคือ

$H_o = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$

$H_1 = \mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4$ ไม่เท่ากันอย่างน้อย 1 คู่

ทดสอบที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จะเห็นว่า $F_0 = 1.10 < F_{0.05,3,12} = 3.49$

จึงยอมรับ Ho

แสดงว่าสูตรอาหารแต่ละสูตรที่ใช้ในการเลี้ยงนกกระทาไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การไข่ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ ง.2 ตัวอย่างการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณอาหารที่นกกระทากินต่อตัวต่อวัน

กลุ่มทดลอง	สัปดาห์ที่					
	1	2	3	4	Xi	Xi
1	20.29	17.06	21.55	21.71	80.61	20.15
2	20.52	24.07	25.15	16.33	86.07	21.52
3	18.33	21.75	25.06	14.81	79.95	19.99
4	19.90	21.11	24.73	17.25	82.99	20.75

X.. = 329.62 X.. = 20.60

SS_T = 154.67

SS_{Tr} = 5.76

SS_E = 148.91

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณอาหารที่นกกระทากินต่อตัวต่อวัน

Source of Variation	Sum of Square	Degree of Freedom	Mean of Square	Fo
Treatment	SS_T	3	1.92	0.15
Error	SS_{Tr}	12	12.41	
Total	SS_E	15		

F_0 = 0.15

$F_{0.05,3,12}$ = 3.49

สมมติฐานเชิงสถิติที่ต้องการทดลอบคือ

$H_o = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$

$H_1 = \mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4$ ไม่เท่ากันอย่างน้อย 1 คู่

ทดสอบที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จะเห็นว่า $F_0 = 0.15 < F_{0.05,3,12} = 3.49$

จึงยอมรับ Ho

แสดงว่าสูตรอาหารแต่ละสูตรที่ใช้ในการเลี้ยงนกกระทาไม่มีผลต่อปริมาณอาหารที่นกกระทากินต่อตัวต่อวันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

<u>ตารางที่ ง. 3</u> **ตัวอย่างการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณอาหารต่อการผลิตไข่ 1 ฟอง**

กลุ่มทดลอง	สัปดาห์ที่					
	1	2	3	4	Xi	Xi
1	77.45	29.86	36.21	28.94	172.46	43.12
2	47.89	29.73	27.09	17.82	122.53	30.63
3	64.17	48.07	38.99	17.20	168.43	42.12
4	55.73	31.67	39.95	19.17	146.52	36.63

X.. = 609.94 X.. = 38.13

$SS_T = 4332.76$

$SS_{Tr} = 396.53$

$SS_E = 3936.23$

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณอาหารต่อการผลิตไข่ 1 ฟอง

Source of Variation	Sum of Square	Degree of Freedom	Mean of Square	Fo
Treatment	SS_T	3	132.18	0.40
Error	SS_{Tr}	12	328.02	
Total	SS_E	15		

$F_0 = 0.40$

$F_{0.05,3,12} = 3.49$

สมมติฐานเชิงสถิติที่ต้องการทดสอบคือ

$H_o = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$

$H_1 = \mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4$ ไม่เท่ากันอย่างน้อย 1 คู่

ทดสอบที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จะเห็นว่า $F_0 = 0.40 < F_{0.05,3,12} = 3.49$

จึงยอมรับ Ho

แสดงว่าสูตรอาหารแต่ละสูตรที่ใช้ในการเลี้ยงนกกระทาไม่มีผลต่อปริมาณอาหารที่นกกระทากินต่อการผลิตไข่ 1 ฟองที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ ง. 4 ตัวอย่างการวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักไข่

กลุ่มทดลอง	สัปดาห์ที่					
	1	2	3	4	Xi	Xi
1	10.30	9.76	9.52	9.83	39.41	9.85
2	9.71	10.13	9.57	9.43	38.84	9.71
3	10.39	9.77	9.78	9.66	39.60	9.90
4	10.70	10.37	10.27	10.43	41.77	10.44

X.. = 159.62 X.. = 9.98

$SS_T = 2.26$

$SS_{Tr} = 1.24$

$SS_E = 1.02$

หอสมุดกลาง
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักไข่

Source of Variation	Sum of Square	Degree of Freedom	Mean of Square	Fo
Treatment	SS_T	3	0.41	4.82
Error	SS_{Tr}	12	0.085	
Total	SS_E	15		

$F_0 = 4.82$

$F_{0.05,3,12} = 3.49$

สมมติฐานเชิงสถิติที่ต้องการทดสอบคือ

$H_o = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$

$H_1 = \mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4$ ไม่เท่ากันอย่างน้อย 1 คู่

ทดสอบที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จะเห็นว่า $F_0 = 4.82 < F_{0.05,3,12} = 3.49$

จึงยอมรับ Ho

แสดงว่าสูตรอาหารแต่ละสูตรที่ใช้ในการเลี้ยงนกกระทามีผลต่อน้ำหนักไข่ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05