ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเพาะสาหร่าย (Culture media)

1. Zarrouk’s medium

สารอาหารหลัก (Macroelements)

	กรัมต่อลิตร
$NaHCO_3$	16.80
K_2HPO_4	0.50
$NaNO_3$	2.50
K_2SO_4	1.00
NaCl	1.00
$MgSO_4.7H_2O$	0.20
$CaCl_2$	0.04
$FeSO_4.7H_2O$	0.01
$Na_2EDTA.2H_2O$	0.08

ละลายส่วนผสมดังกล่าวให้เข้ากันโดยควรละลายเกลือฟอสเฟตเป็นอันดับสุดท้าย.

สารอาหารรอง (Microelements)

Solution A_5	1 มิลลิลิตรต่อลิตร
Solution B_6	1 มิลลิลิตรต่อลิตร

อาหารที่เตรียมเสร็จใหม่ ๆ ภายหลังการฆ่าเชื้อแล้วควรมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 8.7-9.3 โดยที่สารละลาย A_5 และ B_6 ควรเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

1. การวัดค่าสี Hunter system, L*, a* และ b*

1.1 การวัดสีโดยระบบสีของ (Hunter Color System) ประกอบด้วยตัวแปรของสี 3 ตัว คือ L, a, และ b ซึ่งมีความหมายดังนี้

L คือ ค่าความแตกต่างของสี ซึ่งมีค่าจาก 0 คือ สีดำ ถึง 100 คือ สีขาว

a คือ ค่าที่บ่งบอกความเป็นสีเขียว และสีแดงที่อยู่ในตัวอย่าง

โดย ค่า a^+ แสดงถึงค่าความเป็นสีแดง

ค่า a- แสดงถึงค่าความเป็นสีเขียว

b คือ ค่าที่บ่งบอกความเป็นสีเหลือง และสีน้ำเงินที่อยู่ในตัวอย่าง

โดย ค่า b^+ แสดงถึงค่าความเป็นสีเหลือง

ค่า b- แสดงถึงความเป็นสีน้ำเงิน

1.2 การใช้เครื่อง Handy Colorimeter

1.2.1 กด AVE

1.2.2 กด AVE คู่กับ CAL จะขึ้น CALIBRATION

1.2.3 กด PRINT ขึ้น D 65%

1.2.4 กด PRINT ขึ้น X 82.04

1.2.5 กด PRINT ขึ้น Y 86.19

1.2.6 กด PRINT ขึ้น Z 90.18

1.2.7 ถ้าตัวเลขขึ้นไม่ตรงกับที่ต้องการ ปรับขึ้น-ลง ตามปุ่มลูกศร

1.2.8 กด PRINT ขึ้น Read CAL BOARD

1.2.9 นำไปวางบน BROAD กดปุ่มด้านหลัง 1 ครั้ง จะขึ้น 0.00 ทุกค่า

1.2.10 นำตัวอย่างใส่ภาชนะให้ถึงขีด วางในฐานสีดำ

1.2.11 นำเครื่อง Colorimeter วางบนฐาน กดปุ่มด้านหลัง 1 ครั้ง

1.2.12 จดค่าที่ได้

1.2.13 เมื่อใช้เสร็จ กด AVE ค้างจนกว่าจะขึ้น POWER OFF

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 2002)

1.1 เครื่องมือ/อุปกรณ์

1.1.1 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) 100 – 110 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Memmert (บริษัทไซแอนติฟิค โปรโมชั่น จำกัด,ประเทศเยอรมัน)

1.1.2 ถ้วยหาความชื้นพร้อมฝาปิด (Aluminum can, Moisture can)

1.1.3 โถดูดความชื้น (Desiccator)

1.1.4 ครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.1.5 Tongs หรือ Forceps

1.2 วิธีการวิเคราะห์

1.2.1 หาน้ำหนักที่คงที่ของถ้วยหาความชื้น โดยนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 105±0.5 องศาเซลเซียส นาน 2-4 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักแล้วนำเข้าตู้อบใหม่ ดำเนินการเหมือนครั้งแรก จนได้น้ำหนักคงที่ (น้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไม่มากกว่า 1 กรัม)

1.2.2 ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 กรัม ใส่ลงในถ้วยหาความชื้น ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว

1.2.3 เกลี่ยตัวอย่างแผ่ออกให้สม่ำเสมอให้มีเนื้อที่มากที่สุดเท่าที่จะทำได้

1.2.4 นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2-4 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก (น้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไม่มากกว่า 1 กรัม)

1.2.5 นำผลที่ได้ไปคำนวณปริมาณความชื้นดังนี้

1.3 วิธีการคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (\%)} = \frac{\text{(น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ - น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Kjeldahl method) (AOAC, 2002)

2.1 เครื่องมือ/อุปกรณ์

2.1.1 ชุดกลั่นโปรตีน (semi-microdistillation apparatus)

2.1.2 Tube stand

2.1.3 Kjeldahl steam distillation unit

2.1.4 Exhaust manifold และ Aspirator

2.1.5 Buret

2.1.6 Erlenmeyer flask

2.1.7 Glass bead

2.1.8 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

2.2 สารเคมี

2.2.1 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น ถพ. 1.84 , N_2-free

2.2.2 สารเร่งปฏิกิริยา: $CuSO_4.5H_2O$ 1 ส่วน ต่อ K_2SO_4 หรือ anhydrous Na_2SO_4 9 ส่วน

2.2.3 NaOH 32%

2.2.4 Boric acid 4% (บริษัท Fisher scientific, ประเทศอังกฤษ) เตรียมโดยใช้น้ำร้อน

2.2.5 สารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มัล : HCl 8.2 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

2.2.6 Mix indicator : Methyl red 0.1 กรัม ผสมกับ Bromocresol green 0.1 กรัมในเอทานอล 100 มิลลิลิตร

2.3 วิธีการวิเคราะห์

2.3.1 พับกระดาษกรองเป็นรูปซองจดหมาย ชั่งตัวอย่างลงในกระดาษกรองเบอร์ 1 ให้ได้น้ำหนักตัวอย่างประมาณ 1 กรัม

2.3.2 เติมคอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม โปตัสเซียมซัลเฟต 10 กรัม

2.3.3 เติม H_2SO_4 conc. 12 มิลลิลิตรใส่ Glass bead 2-3 เม็ด หยด Octanol 2-3 หยด เพื่อป้องกันการ Bumping ขณะย่อย

2.3.4 ทำการ Preheat digestion box ก่อนให้มีอุณหภูมิประมาณ 550 องศาเซลเซียส นานประมาณ 15 นาที แล้วลดอุณหภูมิให้เหลือ 420 องศาเซลเซียส

2.3.5 นำ digestion tube เข้าเครื่องย่อยประมาณ 30-45 นาที หรือจนกว่าจะได้สารละลายใส แล้วทิ้งให้เย็น

2.3.6 นำ Tube เข้าเครื่อง Distillation เครื่องนี้จะทำการเติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร และ NaOH มิลลิลิตร ตั้งเวลา 4 นาที

2.3.7 เมื่อเกิดก๊าซ NH_3 จะถูกดักจับด้วย Boric acid ที่เติม Indicator ไว้แล้ว จะได้สารละลายสีเขียว

2.3.8 นำสารละลายที่ได้มาไทเทรตด้วย 0.1 N HCl จนถึงจุดยุติจะได้สารละลายสีชมพู

2.3.9 บันทึกปริมาณ HCl ที่ใช้ไเทรต และคำนวณผลดังนี้

2.4 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (\%)} = \frac{(T-B) \times 14.007 \times 100 \times N}{\text{Weight of sample (mg)}}$$

$$\text{โปรตีน (\%)} = \text{\% Nitrogen} \times \textit{conversion factor (F)}$$

เมื่อ T = sample titration (ml)

B = blank titration (ml)

N = normality of titrant (N)

conversion factor = แฟคเตอร์สำหรับแปลงกลับ = 6.25

(น้ำหนักกรัมสมบูรณ์ของไนโตรเจนเท่ากับ 14.007)

3. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC, 2002)

3.1 เครื่องมือ/อุปกรณ์

3.1.1 ชุดสกัดไขมัน (Soxtec Avanti 2050 Auto System)

3.1.2 Electric mrffle Furnace

3.1.3 โถดูดความชื้น (Desicator)

3.1.4 Electric burner

3.2 วิธีการวิเคราะห์

3.2.1 ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 3-5 กรัม โดยใช้กระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักรองรับ ห่อตัวอย่างให้มิดชิดด้วยกระดาษกรองแล้วใส่ลงใน Extraction thimble คลุมด้วยสำลีที่ปราศจากไขมันในช่อง Thimble เพื่อให้การกระจายตัวของสารละลายสม่ำเสมอ นำ Extraction thimble ใส่ลงในเครื่อง Soxtec

3.2.2 เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ลงในขวดกลั่นที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 150 มิลลิกรัม ประกอบเครื่อง Soxtec เข้าด้วยกันให้ความร้อนทำการสกัดไขมันจากตัวอย่างนานประมาณ 3-4 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นจาก Condenser มีอัตราหยด 10 มิลลิลิตรต่อนาที

3.2.3 กลั่นเอาปิโตรเลียมอีเทอร์ออกจากไขมัน นำขวดกลั่น และไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ชั่งน้ำหนักทำการอบซ้ำนานครั้งละ 30 นาที และชั่งน้ำหนักจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณไขมันจากสูตร

3.3 วิธีการคำนวณ

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

เมื่อ W = น้ำหนักตัวอย่าง

W_1 = น้ำหนักของถ้วย และน้ำหนักไขมัน (น้ำหนักหลังอบ)

W_2 = น้ำหนักของถ้วยเปล่าคงที่

4. การหาปริมาณเถ้า (AOAC, 2002)

4.1 เครื่องมือ/อุปกรณ์

4.1.1 ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (Crucible)

4.1.2 โถดูดความชื้น (Desicator)

4.1.3 Electric muffle Furnace

4.1.4 Electric burner

4.2 วิธีการวิเคราะห์

4.2.1 อบ Crucible ที่อุณหภูมิ 105±0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของตัวอย่างประมาณ 4-6 กรัม ใส่ Crucible แล้วนำไปเผาไฟอ่อน ๆ บน Electric burner จนควันหมด

4.2.2 นำมาเผาในเตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 550±20 องศาเซลเซียส นานประมาณ 2-3 ชั่วโมง จนกระทั่งได้เถ้าสีขาว หรือสีเทา

4.2.3 นำออกมาลดอุณหภูมิใน Hot air oven ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่ใน Desiccator ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปชั่ง เผาตัวอย่างซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 1 มิลลิกรัม

4.3 วิธีการคำนวณ

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

เมื่อ W = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ (กรัม)

W_1 = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ และตัวอย่างก่อนเผา (กรัม)

W_2 = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ และตัวอย่างหลังจากเผา (กรัม)

5. การวิเคราะห์ปริมาณเส้นใย (AOAC, 2002)

5.1 เครื่องมือ/อุปกรณ์

5.1.1 Crucible สำหรับกรอง ทำจาก Borosilicate glass

5.1.2 Fiber extraction unit (Hot extraction, Cold extraction)

5.1.3 โถดูดความชื้น (Desicator)

5.1.4 Hot air oven ยี่ห้อ Memmert (บริษัท ไซแอนติฟิค โปรโมชั่น จำกัด, ประเทศเยอรมัน)

5.1.5 Muffle Furnace

5.1.6 Cyclotec sample mill

5.2 สารเคมี

5.2.1 H_2SO_4 1.25 %

5.2.2 NaOH 1.25

5.2.3 Acetone

5.2.4 น้ำกลั่น

5.2.5 Celite

5.3 วิธีการวิเคราะห์

5.3.1 ชั่งตัวอย่างน้ำหนักที่บดแล้ว 1 กรัม (W_1) โดยชั่งใน Crucible เติม Celite 1 กรัม เพื่อในการกรองแล้วนำไปเข้าเครื่อง Fiber extraction unit ในส่วน Hot extraction ดำเนินการดังนี้

5.3.1.1 Hot extraction step 1 : วาง Crucible ในช่องเติมกรดซัลฟิวริกร้อยละ 1.25 ที่ร้อนประมาณ 150 มิลลิลิตร และหยด n-octanol 2-4 หยด เพื่อป้องกันการ Foaming ต้มให้เดือดและจับเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ร้อน 30 มิลลิลิตร 3 ครั้ง แต่ละครั้งต้องระบายน้ำออกด้วย

5.3.1.2 Hot extraction step 2 : เติม NaOH 1.25% ที่ร้อนประมาณ 150 มิลลิลิตร และหยด n-octanol 2-4 หยด เพื่อป้องกันการ Foaming ต้มให้เดือดและจับเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ร้อน 30 มิลลิลิตร 3 ครั้ง แต่ละครั้งต้องระบายน้ำออกด้วย

5.3.2 นำ Crucible เข้า Cold extraction เติม Acetone 25 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที กรองแล้วทำซ้ำ

5.3.3 นำ Crucible เข้า Hot air oven เพื่อระเหย Solvent และ Dry crucible ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง นำมาทิ้งให้เย็นใน Desiccator และชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของกาก (W_2) จากนั้นนำ Crucible มาเข้า Furnace ที่อุณหภูมิ 525 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาลดอุณหภูมิให้ได้ 250 °C ใน Hot air oven เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาทิ้งให้เย็นใน Desicaator และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน (W_3)

5.4 วิธีการวิเคราะห์

$$\text{Crude Fiber (\%)} = \frac{W_2 - W_3}{W_1} \times 100$$

เมื่อ W_1 = น้ำหนักตัวอย่าง

W_2 = น้ำหนักแห้งของกาก

W_3 = น้ำหนักเถ้า

3-123

6. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (AOAC, 2002)

คำนวณได้จากผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างแห้ง และปริมาณขององค์ประกอบอื่น ๆ

ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (%) = 100 - (โปรตีน+ไขมัน+เยื่อใย+ความชื้น+เถ้า)

7. การวิเคราะห์ปริมาณซี-ไฟโคไซยานินรวม (ดัดแปลงจาก Miyakawa, K., Siam algae Co., Ltd. personal communication)

7.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

7.1 ชุดกรองเมมเบรน (Membrane filter)

7.2 กระดาษกรอง Sartorius-membrane filter GMBH ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร ขนาดช่องผ่าน 0.6 ไมโครเมตร

7.3 เครื่องปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump)

7.4 หลอดฉีดยา (Syring)

7.5 ขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร

7.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

7.7 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)

7.8 เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

7.2 สารเคมี

7.2.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0

7.3 วิธีการ

7.3.1 ชั่งตัวอย่าง 5 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดเซนติฟิวจ์

7.3.2 เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

7.3.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในที่มืด จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงนาน 10 นาที ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที

7.3.4 นำส่วนใสที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร โดยใช้ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็น blank

7.3.5 นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณซี-ไฟโคไซยานินจากสูตรการคำนวณ

7.4 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณซี-ไฟโคไซยานิน (มิลลิกรัม)} = \frac{(\text{Abs. } 620) \times 1000 \times 5}{6500}$$

Abs. = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

1000 = ตัวเลขแสดงการเปลี่ยนหน่วยความเข้มข้น

5 = ปริมาณเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น (มิลลิลิตร)

6500 = ปริมาณไฟโคไซยานินมาตรฐาน

$$\text{ปริมาณซี-ไฟโคไซยานิน (มิลลิกรัมต่อกรัม)} = \frac{\text{ปริมาณซี-ไฟโคไซยานิน (มิลลิกรัม)} \times 1000}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม)}}$$

8. การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์รวม (Total chlorophyll) (ดัดแปลงจาก Bennet and Bogorad, 1973; Vanshak, 1977)

8.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

8.1.1 ผ้ากรองแยกแพลงค์ตรอน ขนาดรุพรุน 50 ไมโครเมตร

8.1.2 เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

8.1.3 กรวยกรอง (Seperator funnel)

8.1.4 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

8.2 สารเคมี

8.2.1 แอบโซลูท เมทานอล (Absolute methanol)

8.3 วิธีการ

8.3.1 เก็บตัวอย่างอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายปริมาตร 5 มิลลิลิตร มากรองผ่านผ้ากรองแยกแพลงค์ตรอน ขนาดรุพรุน 50 ไมโครเมตร

8.3.2 นำผ้ากรองที่มีเซลล์สาหร่ายอยู่ไปใส่ในหลอดทดสอบ จากนั้นเติมแอบโซลูท เมทานอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเย่าให้เข้ากัน

8.2.3 นำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

8.3.4 นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ออกจากส่วนใส่ที่มีสีเขียว

8.3.5 นำส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาดนเมตร

8.4 การคำนวณ

ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)= (Abs. 665 × Factor × Vol. of Methanol)/Vol. of sample

Abs. 665	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร
Factor	=	ค่าแฟกเตอร์ของสาหร่ายสไปรูลิน่ามีค่าเท่ากับ 13.9
Vol. of Methanol	=	ปริมาตรของเมทานอล (มิลลิลิตร)
Vol. of sample	=	ปริมตราของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

9. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนด้วยวิธีนินไฮดริน (Ninhydrin method)

9.1 สารเคมี

9.1.1 สารละลายนินไฮดริน เตรียมโดยละลาย $SnCl_2.2H_2O$ 0.8 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ซิเทรต (พีเอช 5.0) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมรวมกับสารละลาย methyl cellosolve ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่มีนินไฮดริน (triketohydrindene hydrate) ละลายอยู่ด้วย 20 กรัม

9.1.2 สารละลายบัฟเฟอร์ซิเทรต 0.2 โมลาร์ พีเอช 5.0 เตรียมโดยละลายกรดซิทริก ($C_6H_8O_7.H_2O$) 21.008 กรัม ในสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์แมล จำนวน 200 มิลลิลิตร และปรับปริมาสตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

9.1.3 methyl cellosolve เตรียมโดยละลายเมทิลเซลโลโซฟในน้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากัน

9.1.4 สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนความเข้มข้น 1.6-2.0 มิลลิโมลาร์ เพื่อการวิเคราะห์ตัวอย่างปริมาตร 0.2 หรือ 0.5 มิลลิลิตร ให้เจือจางสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนอีก 1 : 1 หรือ 1 : 4 ตามลำดับ

9.1.5 น้ำกลั่น (distilled water)

9.2 วิธีการวิเคราะห์

9.2.1 ดูดสารละลายมาตรฐานกระอะมิโนปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ) ใส่ลงในหลอดทดลอง กรณีของแบลงก์ให้ใช้น้ำกลั่นแทน

9.2.2 เติมสารละลายนินไฮดรินลงไปในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร

9.2.3 ปิดหลอดทดลองด้วยฝาปิดอะลูมิเนียม เขย่าให้เข้ากัน แช่หลอดทดลองในน้ำต้มเดือดพล่านเป็นเวลา 20 นาที

9.2.4 จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงในหลอดทดลอง 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที

9.2.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ภายใน 1 ชั่วโมง เทียบกับกราฟมาตรฐานที่ใช้กรดอะมิโนเป็นสารละลายมาตรฐาน

9.3 การคำนวณ

9.3.1 การสร้างกราฟมาตรฐานกรดอะมิโน ให้กลูตามิกเป็นกรดอะมิโนมาตรฐาน โดยใช้ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนเท่ากับ 0.1 มิลลิลิตร ที่แปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-2.0 มิลลิโมลาร์ ทั้งหมด 6 ความเข้มข้น

9.3.2 จากกราฟมาตรฐานกรดอะมิโน สามารถสร้างเป็นตารางแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกรดอะมิโน (เป็นมิลลิโมลาร์) กับค่าการดูดกลืนแสง (0.01-1.00) โดยกำหนดให้มีช่วงของค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.01 หน่วย

9.3.3 ถ้าค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มากกว่า 1.00 ให้เจือจางสารผสมหลังปฏิกิริยาเกิดสีดังกล่าวด้วยสารละลายเจือจางอีก 5 หรือ 10 มิลลิลิตร (ตามความเหมาะสม) และคูณค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้ด้วยแฟกเตอร์ 11.1/6.1 หรือ 16.1/6.1 ตามลำดับ

9.3.4 กราฟมาตรฐานที่ได้ แสดงสหสัมพันธ์เส้นตรงเป็นไปตามกฎของเบียร์ที่ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.50 โดยมีค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐาน 4.0 % จากเส้นตรงที่ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.0

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา

1. การวิเคราะห์จุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count)

1.1 อุปกรณ์

1.1.1 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
1.1.2 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubators)
1.1.3 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
1.1.4 ปิเปตขนาด 1.0 และ 10.0 มิลลิลิตร
1.1.5 จานเพาะเชื้อ (petri dish)
1.1.6 ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
1.1.7 หลอดทดลอง (test tube) พร้อมฝาปิด
1.1.8 เครื่องผสม (vortex mixer)
1.1.9 เครื่องให้ความร้อน (hotplate)

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) ประกอบด้วย

Tryptone	5	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Dextrose	1	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

1.3 สารละลายสำหรับเจือจาง Butterfield's Phosphate-Buffered ประกอบด้วย

KH_2PO_4	34	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

1.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อและละลายด้วยน้ำกลั่นบนเตาไฟฟ้า (hot plate) จนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีใส ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร แล้วเทใส่ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer

flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดด้วยพลาสติกทนความร้อนหรือสำลี นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

1.5 การเตรียมสารละลายสำหรับเจือจาง

1.5.1 ละลาย KH_2PO_4 ในน้ำกลั่น ปรับพีเอชให้ได้ 7.2 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร ได้เป็น stock solution

1.5.2 ในการใช้งานให้ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่เตรียมไว้จากข้อ1. ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

1.5.3 ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายใส่หลอดทดลอง หลอดละ 9 มิลลิลิตร ปิดฝาด้วยพลาสติกทนความร้อนหรือสำลี นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

1.6 วิธีการวิเคราะห์

1.6.1 ทำการเจือจางตัวอย่างโดยใช้ปิเปตต์ดูดตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลายสำหรับเจือจางตัวอย่าง 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม จะได้สารละลายตัวอย่างที่ระดับเจือจาง 1:10 หรือ 10^{-1}

1.6.2 นำสารละลายตัวอย่างเจือจางจากข้อ 1. มาทำการเจือจางจนได้ระดับที่ต้องการ (หรือทำให้เจือจางจนกว่าจะอ่านจำนวนจุลินทรีย์ได้ 25-250 โคโลนี) ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ

1.6.3 ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายตัวอย่างที่ระดับเจือจางต่าง ๆ ลงในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร

1.6.4 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่ยังเหลวอยู่ซึ่งมีอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อที่มีสารละลายตัวอย่างผสมสารละลายตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันดี วางทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว จากนั้นคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อลง

1.6.5 บ่มเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 35-37องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

1.6.6 คัดเลือกจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี นับจำนวนโคโลนี พร้อมหาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่นับได้ในแต่ละระดับความเจือจาง คูณด้วยค่า dilution factor ของระดับความเจือจางที่นับได้ คำนวณเป็นโคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม (CFU/g)

2. การวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และรา

2.1 อุปกรณ์

2.1.1 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
2.1.2 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubators)
2.1.3 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
2.1.4 ปิเปตขนาด 1.0 และ 10.0 มิลลิลิตร
2.1.5 จานเพาะเชื้อ(petri dish)
2.1.6 ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
2.1.7 หลอดทดลอง (test tube) พร้อมฝาปิด
2.1.8 เครื่องผสม (vortex mixer)
2.19เครื่องให้ความร้อน (hotplate)

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

2.2.1 Potato Dextrose Agar (PDA)
2.2.2 เปปโตน (peptone)
2.2.3 สารละลายกรดทาร์ทาลิก (tartalic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 10

2.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 39 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมดและมีสีใส ปรับพีเอชให้เท่ากับ 3.5 ด้วยสารละลายกรดทาร์ทาริก ความเข้มข้นร้อยละ 10 แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2.4 การเตรียมสารละลายสำหรับเจือจาง

ชั่ง peptone 50 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลาย peptone ใส่ในหลอดทดลอง 9 มิลลิลิตร ปิดฝาด้วยพลาสติกทนความร้อน

หรือสำสี นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2.5 วิธีการวิเคราะห์

2.5.1 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ยังเหลวอยู่ซึ่งมีอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อ วางทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว จากนั้นคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อลง ทิ้งไว้ประมาณ 2 วันเพื่อตรวจดูว่ามีการปนเปื้อนหรือไม่

2.5.2 ทำการเจือจางตัวอย่างโดยใช้ปิเปตต์ดูดตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลายสำหรับเจือจางตัวอย่าง 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม จะได้สารละลายตัวอย่างที่ระดับเจือจาง 1:10 หรือ 10^{-1}

2.5.3 นำสารละลายตัวอย่างเจือจางจากข้อ 1. มาทำการเจือจางจนได้ระดับที่ต้องการ (หรือทำให้เจือจางจนกว่าจะอ่านจำนวนจุลินทรีย์ได้ 25-250 โคโลนี)

2.5.4 ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายตัวอย่างที่ระดับเจือจางต่าง ๆ ลงในจานเพาะเชื้อจานละ 0.1 มิลลิลิตรใช้แท่งแก้วพิเศษ (spreader) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อที่แข็งตัวแล้ว

2.5.5 บ่มเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.5.6 คัดเลือกจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนี 25-250 โคโลนี มานับจำนวนพร้อมหาค่าเฉลี่ยของโคโลนีที่เกิดขึ้นในแต่ละระดับความเจือจาง คูณด้วยค่า dilution factor ของแต่ละระดับความเจือจางที่นับได้ คำนวณเป็นจำนวนโคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม (CFU/g)

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส

1. วิธีการประเมินการยอมรับโดยการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีประเมินความชอบแบบ 9–Point Hedonic Scale

วิธีการประเมินการยอมรับเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากกว่าวิธีการประเมินความชอบ เนื่องจากสามารถประเมินหนึ่งตัวอย่างหรือมากกว่าได้ รวมถึงข้อมูลที่ได้จะทำให้ทราบผู้ประเมินชอบผลิตภัณฑ์มากน้อยแค่ไหน จึงเป็นวิธีที่เหมาะจะนำไปใช้ในการประมาณผู้บริโภคเป้าหมายที่มีจำนวนมาก ๆ จัดเตรียมใบรายงานผล เตรียมตัวอย่างทดสอบโดยใช้ตาราง Random permutation เพื่อกำหนดเลขรหัส 3 หลัก กับผลิตภัณฑ์ที่จะทำการทดสอบ อธิบายรายละเอียดต่าง ๆ ของการทดสอบให้ผู้ทดสอบทราบ ให้ผู้ทดสอบให้คะแนนในด้านคุณลักษณะต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์ วิธีการทดสอบใช้แบบ 9–Point hedonic scale โดยให้ระดับคะแนนที่ 1 หมายถึง ไม่ชอบมากที่สุด และระดับคะแนนที่ 9 หมายถึง ชอบมากที่สุด

ระดับคะแนนความชอบสำหรับการทดสอบการยอมรับ

ระดับคะแนน	ลักษณะความชอบ	
1	ไม่ชอบมากที่สุด	(Dislike extremely)
2	ไม่ชอบมาก	(Dislike very much)
3	ไม่ชอบปานกลาง	(Dislike moderrately)
4	ไม่ชอบเล็กน้อย	(Dislike slightly)
5	เฉยๆ	(Neither like nor dislike)
6	ชอบเล็กน้อย	(Like slightly)
7	ชอบปานกลาง	(Like moderrately)
8	ชอบมาก	(Like very much)
9	ชอบมากที่สุด	(Like extremely)

แบบทดสอบ

การทดสอบความชอบแบบวิธี 9-Point Hedonic Scale

ลำดับที่ .....

ตัวอย่าง ซุปสาหร่ายสไปรูลิน่าสกัดพร้อมดื่ม

ชื่อผู้ทดสอบ..... วันที่ .....

คำชี้แจง กรุณาทดสอบตัวอย่างตามลำดับที่นำแสนอ แล้วให้คะแนนความชอบในด้านต่างๆ (กรุณาบ้วนปากก่อนทำการทดสอบตัวอย่างต่อไป)

โดยกำหนดให้ 1 = ไม่ชอบที่สุด 2 = ไม่ชอบมาก 3 = ไม่ชอบปานกลาง
4 = ไม่ชอบเล็กน้อย 5 = เฉยๆ 6 = ชอบเล็กน้อย
7 = ชอบปานกลาง 8 = ชอบมาก 9 = ชอบมากที่สุด

รหัส	811	745	256	456	890
สี	.....	.....	.....	.....	.....
กลิ่นรส	.....	.....	.....	.....	.....
รสชาติ	.....	.....	.....	.....	.....
ความชอบรวม	.....	.....	.....	.....	.....

ข้อเสนอแนะ

.....

-ขอบคุณ-

ประวัติผู้วิจัย

นายมณชัย เดชสังกรานนท์ เกิดเมื่อวันที่ 25 ธันวาคม 2520 ณ โรงพยาบาลศูนย์จังหวัดนครปฐม สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จากคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อ พ.ศ. 2546 หลังสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาโททำงานเป็นผู้ช่วยนักวิจัย ณ สถาบันวิจัยไวน์และสุราพื้นบ้าน คณะวิศวกรรมและเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ตั้งแต่ มิถุนายน 2546-พฤษภาคม 2547 ปัจจุบันเป็นอาจารย์สังกัดคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ตั้งแต่ มิถุนายน 2547-ปัจจุบัน ในระหว่างการเป็นอาจารย์ ได้รับรางวัลนักวิจัยดีเด่น เครือข่ายวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏภาคกลางกลุ่มรัตนโกสินทร์ สาขาวิชาการที่มีความสนใจ ได้แก่ เทคโนโลยีชีวภาพ เทคโนโลยีการหมัก การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ เทคโนโลยีเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และการเพาะเลี้ยงสาหร่าย