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 (A.O.A.C., 2000)

1.1 เครื่องมือ/อุปกรณ์

1.1.1 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) 100 – 110 °C ยี่ห้อ Memmert (บริษัท ไซแอนติฟิค โปรโมชั่น จำกัด,ประเทศเยอรมัน)

1.1.2 ถ้วยหาความชื้นพร้อมฝาปิด (Aluminum can , Moisture can)

1.1.3 โถดูดความชื้น (Desiccator)

1.1.4 ครื่องชั่ง ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.1.5 Tongs หรือ Forceps

1.2 วิธีการวิเคราะห์

1.2.1 หาน้ำหนักที่คงที่ของถ้วยหาความชื้น โดยนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 105±0.5 °C 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 °C นาน 2-4 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก (น้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไม่มากกว่า 1 กรัม)

1.2.5 นำผลที่ได้ไปคำนวณปริมาณความชื้นดังนี้

1.3 วิธีการคำนวณ

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

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

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1.1 ผ้ากรองแยกแพลงค์ตรอน ขนาดรูพรุน 50 ไมโครเมตร

2.1.2 เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

2.1.3 กรวยกรอง (Seperator funnel)

2.1.4 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

2.2 สารเคมี

2.2.1 แอบโซลูท เมทานอล (Absolute methanol)

2.3 วิธีการ

2.3.1 เก็บตัวอย่างอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายปริมาตร 5 มิลลิลิตร มากรองผ่านผ้ากรองแยกแพลงค์ตรอน ขนาดรูพรุน 50 ไมโครเมตร

2.3.2 นำผ้ากรองที่มีเซลล์สาหร่ายอยู่ไปใส่ในหลอดทดสอบ จากนั้นเติมแอบโซลูทเมทานอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเย่าให้เข้ากัน

2.2.3 นำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

2.3.4 นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ออกจากส่วนใส่ที่มีสีเขียว

2.3.5 นำส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาดนเมตร

2.4 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)

3. การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

นำตัวอย่างอาหารเพาะเลี้ยงที่กรองแยกเซลล์สาหร่ายอกไปแล้ว ไปวัดค่าค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ (ph meter)

4. การวิเคราะห์ปริมาณไนเตรททั้งหมด (Total nitrate concentration) (APHA, 1998)

4.1 สารละลายบรูซีน-กรดซัลฟานิลิก (Brucine-Sulfanilic Acid Solution)

ละลายบรูซีนซัลเฟต (Brucine Sulfate) 1 กรัม และกรดซัลฟานิลิค 0.1 กรัม ในน้ำร้อน 70 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ต้มจนเดือด จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรสารละลายนี้จะคงตัวอยู่ได้นานหลายเดือน ถ้ามีสีชมพูเกิดขึ้นจะไม่มีผลต่อการวิเคราะห์

4.2 สารละลายซัลฟูริก

เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

4.3 สารละลายโพแทสเซียมไนเทรตมาตรฐาน

ละลายแอนไฮดรัสโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) 0.7218 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร (สารละลายนี้มีความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) จากนั้นเตรียมอนุกรมของสารละลายโพแทสเซียมไนเทรตมาตรฐานโดยนำสารละลายไนเตรทมาตรฐานมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของไนโตรเจนดังตารางที่ 1 ดังนี้

ตารางที่ ค-1 ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเทรตและความเข้มข้นของไนโตรเจน

ความเข้มข้นโพแทสเซียมไนเทรต (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0.000	0
0.014	2
0.029	4
0.043	6
0.058	8
0.072	10

4.4 วิธีวิการ

4.4.1 ตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร

4.4.2 เติมสารละลายบรูซีน-ซัลฟานิลิค ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

4.4.3 เติมกรดซัลฟูริค ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วเก็บในตู้มืดเป็นเวลา 10 นาที

4.4.4 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ แล้วเก็บในตู้มืด 30 นาที

4.4.5 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มิลลิลิตร

4.4.6 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

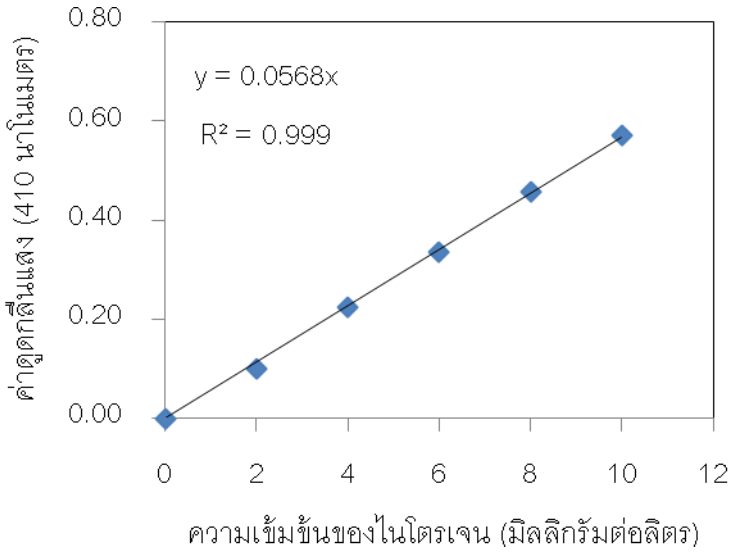
4.4.7 สำหรับการเขียนกราฟมาตรฐานใช้สารละลายไนเทรตมาตรฐานเจือจางให้ได้ความเข้มข้น ดังตารางผนวกที่ 1 (วิธีการนี้สามารถวัดไนโตรเจนได้ไม่เกิน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร)

4.4.8 เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร (ภาพผนวกที่ 1) แล้วหาค่าความชันของกราฟ (m)

4.5 การคำนวณ

$$\text{ความเข้มข้นของไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{Abs. 410} \times D}{m}$$

Abs. 410	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร
D	=	อัตราการเจือจาง
M	=	ค่าความชันของกราฟ



ภาพที่ ค-1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร เทียบกับความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเทรต

5. การวิเคราะห์ปริมาณปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total phosphorus concentration) (APHA, 1998),

5.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

5.1.1 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

5.1.2 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Rack)

5.1.3 หลอดทดสอบ (Test tube)

5.1.4 ขวดสีชา (Dark bottle)

5.2 สารเคมี

5.2.1 Ammonium molybdate ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$)

5.2.2 Ammonium metavanadate (NH_4VO_3)

5.2.3 K_2HPO_4

5.3 รีเอเจ้นต์ Vanadomolybdophosphoric acid (A+B)

A : ชั่ง ammonium molybdate ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) หนัก 25 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลลิตร

B : ชั่ง ammonium metavanadate (NH_4VO_3) หนัก 1.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ต้มเดือดแล้วปริมาตร 300 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B ให้เข้าด้วยกันรอให้เย็น จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 330 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้เท่ากับ 1 ลิตร

5.3 วิธีการ

5.3.1 นำอาหารเลี้ยงสาหร่ายมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 541 เพื่อแยกเซลล์สาหร่าย

5.3.2 เตรียมสต๊อกสารมาตรฐาน K_2HPO_4 (219.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, 1 มิลลิลิตร = 50 µg of PO_4^{3-}-P) ที่มีความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 ไมโครกรัมของฟอสฟอรัส

5.3.3 ตวงสารละลายมาตรฐานหรือตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย Vanadomolybdophosphoric acid ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไป แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 50 มิลลิลิตร

5.3.4 ตั้งไว้นาน 10 นาที แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

5.4 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณฟอสฟอรัส (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{มิลลิกรัมฟอสฟอรัส (ในปริมาตร 50 มิลลิลิตร)} \times 1000}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)}}$$

6. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total protein) (Micro kjeldahl method),

โปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดซึ่งมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนจึงสามารถวิเคราะห์ได้ในรูปของไนโตรเจนโดยวิธีของ Kjeldahl แล้วคำนวณกลับมาเป็นปริมาณโปรตีน สามารถคำนวณปริมาณโปรตีนในวัตถุดิบได้โดยการย่อยวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นโดยใช้ความร้อนช่วยและมีการเติมตัวเร่งปฏิกิริยาลงไปเพื่อให้สารละลายใส เนื่องจากสารอินทรีย์ในวัตถุดิบจะถูกย่อยสลายไปจนหมด โดยยังคงเหลือสารประกอบไนโตรเจนทั้งที่เป็นส่วนของโปรตีนและไม่ใช่โปรตีน ยกเว้นที่อยู่ในรูปไนเตรท (Nitrate, NO_3) และไนไตรท์ (Nitrite, NO_2) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเมื่อเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงไปแล้ว ไนโตรเจนจะอยู่ในรูปของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ส่วนแก๊สแอมโมเนียที่กลั่นได้นี้จะใช้กรดบอริกนี้ที่มีความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นตัวดักจับ จากนั้นเมื่อนำไปทำการไทเทรตหาปริมาณไนโตรเจนด้วยกรดไฮดรอคลอริกหรือกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อหาปริมาณกรดที่ใช้ทำปฏิกิริยากับโปรตีน ในการไทเทรตนี้สามารถคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนได้ โดยทั่วไปแล้วโปรตีนที่มีไนโตรเจนเป็น

องค์ประกอบเฉลี่ย 16 เปอร์เซ็นต์หรือเท่ากับ (100/16 = 6.25) ดังนั้นจึงสามารถคำนวณหาปริมาณโปรตีนหยาบ (Crude protein) ได้

การคำนวณ

ปริมาณโปรตีน (เปอร์เซ็นต์) = ค่าเฉลี่ยไนโตรเจนในโปรตีน x Kjeldahl factor

6.1 อุปกรณ์

6.1.1 เครื่องชั่งชนิดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

6.1.2 เครื่องย่อย (Block digestor)

6.1.3 หลอดย่อย (Digestion tube)

6.1.4 Exhaust manifold และ Aspirator

6.1.5 Tube stand

6.1.6 ชุดเครื่องกลั่น (Distilling unit)

6.1.7 ชุดไทเทรต

6.1.8 ตู้ดูดควัน (Fume hood)

6.2 สารเคมี

6.2.1 กรดซัลฟูริกเข้มข้น 95 – 98 เปอร์เซ็นต์ (H_2SO_4 conc., AR grade)

6.2.2 สารเร่งปฏิกิริยา [สารผสมระหว่าง copper sulfate ($CuSO_4.5H_2O$) กับ potassium sulfate (K_2SO_4) ในอัตราส่วน 1:9]

6.2.3 สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล

6.2.4 สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล

6.2.5 Potassium hydrogen phthalate ($C_8H_5KO_4$, AR grade)

6.2.6 ฟีนอล์ฟธาลีน (Phenolphthalein)

6.2.7 สกรีนเมทธิล เรด อินดิเคเตอร์ (Screened methyl red indicator)

6.2.8 กรดบอริกความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 6.2.9 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

6.3 วิธีการย่อยตัวอย่าง

6.3.1 ชั่งตัวอย่างอาหารประมาณ 0.5 - 1 กรัม ใส่ลงในหลอดสำหรับย่อย (digestion tube) หรือ ในกรณีที่เป็นตัวอย่างมีความชื้นสูงจะชั่งลงบนกระดาษกรองที่ปราศจากไนโตรเจน พับกระดาษใส่ลงในหลอดย่อยสำหรับทำเป็น blank

6.3.2 เติมสารเร่งปฏิกิริยาประมาณ 5 กรัม หรือ Kjeldahl catalyst tablets 2 เม็ด และเติมกรดซัลฟุริกเข้มข้นลงไป 13-15 มิลลิลิตร ขึ้นกับปริมาณตัวอย่างที่ใช้ปล่อยให้ทำปฏิกิริยาจนไม่รุนแรง และเติม H_2O_2 36 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) 1 มิลลิลิตร เพื่อกันตัวอย่างปั๊มติดข้างหลอด

6.3.3 ตั้งหลอดย่อยใน stand ปิด heat shield สวม exhaust manifold ลงบนส่วนบนของหลอดย่อย

6.3.4 ตั้ง stand หลอดย่อยและ exhaust ลงบนเครื่องย่อย ยี่ห้อ Tecator รุ่น 2020 ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 420 องศาเซลเซียสแล้ว เพื่อความปลอดภัยควรทำการย่อยภายในตู้ดูดควัน เปิดเครื่องดูดไอกรด (scruber) ช่วงเริ่มต้นจะเปิดแรงประมาณ ทำการย่อยเป็นเวลา 5 นาที และลดวาวล์เพื่อลดอัตราการไหลไอกรดลง ทำการย่อยจนตัวอย่างใส ใช้เวลาประมาณ 30-45 นาที

6.3.5 ยก stand พร้อมหลอดย่อยตัวอย่างออกปล่อยให้เย็นลงเพื่อรอนำไปกลั่น

6.4 การกลั่น

6.4.1 เปิดเครื่องทำน้ำเย็น จนได้อุณหภูมิที่ตั้งไว้ 15 องศาเซลเซียส

6.4.2 เปิดเครื่องปรับแรงดันไฟฟ้า (stabilizer) แล้วเปิดสวิทช์ของเครื่องกลั่น ทำการ warm เครื่องกลั่น (Kjeltec รุ่น 1026) ใช้ flask และหลอดย่อยเปล่า โดยใช้โปรแกรม Manual กดน้ำลง 50 มิลลิลิตร และกด steam กลั่นให้ได้ปริมาตร 100 – 150 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5-7 นาที กด steam เพื่อปิด เช็คไนโตรเจนที่ติดค้างอยู่ในระบบโดยหยดฟีนอล์ฟธาลีนจะไม่เปลี่ยนสี

6.4.3 นำหลอดและ flask ออกจากเครื่องกลั่น

6.4.4 ตั้งโปรแกรมเป็น Auto โดยกดปุ่ม ปรับปริมาณน้ำ (50 มิลลิลิตร) ด่าง (25 มิลลิลิตร) stroke (2), ช่วงห่างของเวลา delay time (0.2 นาที) และเวลาที่ใช้ในการกลั่น (3.6 -3.7 นาที) หรือกลั่นให้ได้ปริมาตร 150 มิลลิลิตร

6.4.5 นำ flask ซึ่งบรรจุกรดบอริกความเข้มข้น 4% ปริมาณ 25-30 มิลลิลิตร ตั้งไว้บน platform ของเครื่องกลั่นและยก platform ขึ้น ให้ปลายแท่งแก้วจุ่มอยู่ใต้กรดบอริก

6.4.6 ใส่หลอดตัวอย่างที่ผ่านการย่อยแล้ว ข้อ 4 เข้ากับเครื่องกลั่น ปิด safety door เครื่องกลั่นจะเริ่มทำงาน

6.4.7 เมื่อกลั่นครบตามเวลาที่กำหนด เครื่องจะหยุดทำงาน นำ flask และหลอดย่อยออกจากเครื่องกลั่น

6.4.8 นำ flask กรดบอริก ที่ดักจับแก๊สแอมโมเนียที่ถูกกลั่นออก ไปไทเทรตหาไนโตรเจนด้วยสารละลาย

6.5 การคำนวณ

$$\text{ไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{14.01 \times (V_1 - V_2) \times N}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)} \times 10}$$

14.01	=	น้ำหนักมวลโมเลกุลของไนโตรเจน
V1	=	ปริมาตรของกรดที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
V2	=	ปริมาตรของกรดที่ใช้ไตเตรท blank (มิลลิลิตร)
N	=	ความเข้มข้นของกรดที่ใช้ไตเตรท (นอร์มอล)
10	=	ค่าคงที่ที่แปลงจากหน่วยกรัมเป็น เปอร์เซ็นต์
F	=	ค่าคงที่เฉพาะเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นโปรตีน

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 การวิเคราะห์ปริมาณซี-ไฟโคไซยานินทั้งหมดในสาหร่ายสด

7.3.1.1 นำตัวอย่างสาหร่ายในปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาใส่ลงชุดกรองเมมเบรน กรองผ่านกระดาษกรอง Sartorius-membrane filter GMBH ต่อชุดกรองเข้ากับเครื่องปั๊มสุญญากาศเพื่อดึงอาหารเพาะเลี้ยงออก ให้เหลือแต่เซลล์สาหร่ายติดอยู่บนเยื่อกรอง

7.3.1.2 ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร 1 ครั้ง เพื่อล้างสารอาหารที่ติดอยู่กับเซลล์ออก และล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร 1 ครั้ง นำเซลล์ออกจากเยื่อกรองโดยใช้หลอดฉีดยาฉีดล้างเซลล์ที่ติดอยู่กับเยื่อกรองด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 ให้ลงในขวดวัดปริมาตรแล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 25 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์

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

7.3.1.4 นำส่วนใสที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร โดยใช้ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็น blank

7.3.1.5 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. การวิเคราะห์ปริมาณพอลิเมอร์นอกเซลล์ทั้งหมด (Total extracellular polymeric substances) (Moore and Tischer, 1964)

8.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

8.1.1 ชุดกรองเมมเบรน (Membrane filter)

8.1.2 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2

8.1.3 เครื่องปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump)

8.1.4 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)

8.1.5 กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 25 มิลลิลิตร

8.1.6 แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)

8.2 สารเคมี

8.2.1. แอบโซลูท เอทานอล (absolute C_2H_6O) 95 เปอร์เซ็นต์

8,3 วิธีการ

8.3.1 นำตัวอย่างสาหร่ายปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาใส่ลงชุดกรองเมมเบรน กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2 ต่อชุดกรองเข้ากับเครื่องปั๊มสุญญากาศ เพื่อดึงอาหารเพาะเลี้ยงออก เหลือแต่เซลล์สาหร่ายติดอยู่บนเยื่อกรอง

8.3.2 นำส่วนใสที่ได้จากการกรองแยกเซลล์สาหร่ายในขั้นต้นมา 5 มิลลิลิตร แล้วเติมเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง

8.3.3 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที

8.3.3 จากนั้นรินส่วนใสออกมาวัดปริมาตรของน้ำใสด้วยกระบอกตวง เติมน้ำกลั่นลงในตะกอนก้นหลอด ใช้แท่งแก้วคนสารคนให้ส่วนผสมของตะกอนกระจายสม่ำเสมอ

8.3.4 นำส่วนผสมนี้ไปวิเคราะห์ปริมาณสารพอลิเมอร์นอกเซลล์ในรูปของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมดตามวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก

9. การวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมด โดยวิธี Phenol-sulfuric method (Dobois et al., 1956).

9.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

9.1.1 หลอดทดสอบ (Test tube)

9.1.2 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)

9.1.3 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

9.1.4 เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

9.1.5 เครื่องชั่งละเอียด

9.2 สารเคมี

9.2.1 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4)

9.2.2 สารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เตรียมโดยชั่งฟีนอล 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 95 กรัม

9.2.3 น้ำกลั่น

9.2.4 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคสมา 0.0400 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรดังนี้

ตารางที่ ค-2 ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสตั้งแต่ 0 - 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หลอดที่	สารละลายกลูโคส	น้ำกลั่น	สารละลายกลูโคส
1	0	1000	0
2	25	975	10
3	50	950	20
4	100	900	40
5	125	875	50
6	200	800	80

9.3 วิธีการ

9.3.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสและการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต/พอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารเลี้ยงสาหร่าย

9.3.1.1 ปิเปตอาหารเลี้ยงสาหร่ายหรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0 - 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ แล้วเติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ลงไป 1 มิลลิลิตร

9.3.1.2 เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยกรดลงไปที่ผิวหน้าของของเหลวจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อย ๆ ปล่อยที่ข้างหลอด

9.3.1.3 ตั้งหลอดทดสอบของสารผสมนี้ไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่าแล้วนำมาบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 – 30 องศาเซลเซียส นาน 10 - 20 นาที

9.3.1.4 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

9.3.1.5 นำค่าดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงสาหร่าย หรือคำนวณได้จาก

9.4 การคำนวณ

$$\text{ความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times 1{,}000}$$

ภาคผนวก ง

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 เจลลี่

ชื่อผู้ทดสอบ..... วันที่ .....

คำชี้แจง กรุณาทดสอบตัวอย่างตามลำดับที่นำแสนอ แล้วให้คะแนนความชอบในด้านสี (กรุณาบ้วนปากก่อนทำการทดสอบตัวอย่างต่อไป)

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

รหัส	811	745	256
สี	.....	.....	.....

ข้อเสนอแนะ

.....

-ขอบคุณ-

แบบทดสอบ

การทดสอบความชอบแบบวิธี 9-Point Hedonic Scale

ลำดับที่ .....

ตัวอย่าง น้ำมะพร้าว

ชื่อผู้ทดสอบ..... วันที่ .....

คำชี้แจง กรุณาทดสอบตัวอย่างตามลำดับที่นำแสนอ แล้วให้คะแนนความชอบในด้านสี (กรุณาบ้วนปากก่อนทำการทดสอบตัวอย่างต่อไป)

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

รหัส	811	745	256
สี	.....	.....	.....

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