ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การตรวจวิเคราะห์ทางด้านเคมี

การวิเคราะห์ทางด้านเคมี

1. การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (Total soluble solid)

1.1 อุปกรณ์

1.1.1 เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Hand refractometer) รุ่น N – 1E ญี่ปุ่น

1.1.2 น้ำกลั่นสำหรับเช็ดล้างทำความสะอาด

1.2 วิธีการวิเคราะห์

1.2.1 ใช้หลอดหยดดูดตัวอย่างมาหยดลงบนปริซึม (Prism) ของเครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ปิดกระจกบนปริซึมทิ้งไว้ประมาณ 5 วินาที

1.2.2 อ่านค่าที่วัดได้ในระดับสายตาในหน่วย ° brix

1.2.3 บันทึกค่าที่อ่านได้

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (DNS method) (Miller, G.L. 1959)

2.1 สารเคมี

2.1.1 สารละลาย 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) 1.0 % เตรียมโดยการชั่งดีเอ็นเอส 10 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายด่างทีละน้อย (NaOH 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) คนให้ละลายเข้ากันจนหมด นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนจนกระทั่งได้สารละลายใสจากนั้นเติม potassium sodium tartrate (Rochelle salt) ลงไปทีละน้อยจนครบ 300 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดรูปสีชาที่อุณหภูมิห้อง

2.1.2 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคสมา 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงดังตารางผนวกที่ ก1

ตารางผนวกที่ ก1 แสดงอัตราความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส ตั้งแต่ 0-0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

หลอดที่	สารละลายกลูโคส (1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0.0	1.0	0.0
2	0.2	0.8	0.2
3	0.4	0.6	0.4
4	0.6	0.4	0.6
5	0.8	0.2	0.8
6	1.0	0.0	1.0

2.2 วิธีการ

2.2.1 ดูดสารละลายตัวอย่าง (ที่ผ่านการหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ออกหมดแล้ว) หรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน(ความเข้มข้น 0.0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ต้องการวิเคราะห์ 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

2.2.2 เติมสารละลายดีเอ็นเอสปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร

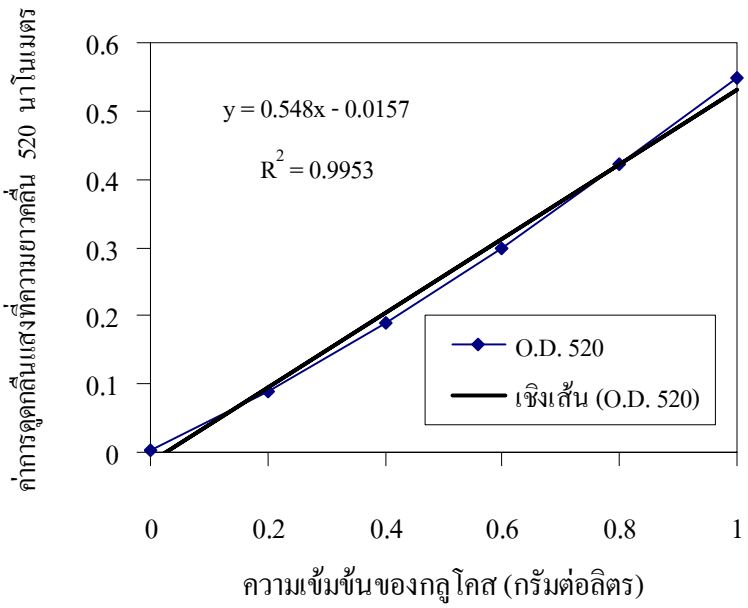
2.2.3 นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

2.2.4 แช่หลอดทดลองในอ่างน้ำเย็น 5 นาที

2.2.5 เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

2.2.6 นำค่าดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน})}$$



แผนภาพผนวกที่ ก1 แสดงกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส และค่าความชัน

3. การวิเคราะห์ค่าพีเอช

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) รุ่น 3020 ยี่ห้อ JENWAY อังกฤษ

3.1.2 บีกเกอร์

3.2 สารเคมี

3.2.1 บัฟเฟอร์มีค่าพีเอช เท่ากับ 4 และค่าพีเอช เท่ากับ 7

3.3 วิธีการวิเคราะห์

3.3.1 ปรับมาตรฐานเครื่องวัดค่าพีเอช โดยการปรับอิเลคโทรด (Electrode) ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (Buffer solution)

3.3.2 ล้างอิเลคโทรดด้วยน้ำกลั่น และเช็ดให้แห้ง

3.3.3 เทตัวอย่างที่ต้องการวัดใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร โดยมีปริมาตรตัวอย่างประมาณ 3 ใน 4 ของบีกเกอร์

3.3.4 จุ่มอิเลคโทรดลงในตัวอย่าง อ่านค่าพีเอช ที่ได้

3.3.5 บันทึกผล

4. การวิเคราะห์ปริมาณกรด (Total Titratable Acidity) (AOAC, 2000)

4.1 อุปกรณ์

4.1.1 บิวเรต

4.1.2 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

4.2 สารเคมี

4.2.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐาน เตรียมโดยชั่ง โซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นซึ่งต้มจนเดือดและทำให้เย็นแล้ว 1,000 มิลลิลิตร

4.2.2 สารละลายฟีนอฟทาลีน เตรียมโดยละลายฟีนอฟทาลีน 1 กรัม ในเอธิลแอลกอฮอล์ 95 % จำนวน 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มัล ทีละหยดจนหยดแรกเป็นสีชมพู เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 200 มิลลิลิตร

4.3 วิธีการวิเคราะห์

4.3.1 ปิเปตตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

4.3.2 เติมน้ำกลั่นจำนวน 10 มิลลิลิตร

4.3.3 หยดสารละลายฟีนอฟทาลีน 2-3 หยดเขย่าให้เข้ากัน

4.3.4 นำไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มัลจนกระทั่งถึงจุดยุติได้เป็นสารละลายสีชมพูอ่อน

4.3.5 คำนวณปริมาณกรดทั้งหมดที่มี

$$\% \text{ กรดแลคติก (lactic acid)} = \frac{\text{มิลลิลิตรของ NaOH} \times \text{Normality ของ NaOH} \times 192 \times 100}{\text{มิลลิลิตรของตัวอย่าง} \times 1{,}000}$$

4.4 การทำ Standardization

4.4.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐาน ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นซึ่งต้มจนเดือดและทำให้เย็นแล้ว 1,000 มิลลิลิตร

4.4.2 การทำ Standardization เพื่อหาความเข้มข้นที่แน่นอนของ NaOH เตรียม Standard Potassium hydrogen phathalate (KHP) โดยการอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน นำออกมาทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น จากนั้นนำมาชั่งใส่ฟลาส์ก 250 มิลลิลิตร จำนวน 3 ใบ ๆ ละ 0.1 กรัม บันทึกน้ำหนักไว้ เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เขย่าจน KHP ละลายหมด หยดสารละลายฟีนอฟทาลีน 3 หยด ทำการไตเตรท ด้วย 0.1 นอร์มัล NaOH ที่

เตรียมไว้ บันทึกปริมาตรที่ใช้ นำไปคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของ NaOH ตามสูตรดังต่อไปนี้

$$\text{ความเข้มข้นของ NaOH} = \frac{\text{น้ำหนักของ KHP} \times 1000}{\text{mL ของ NaOH} \times 204.229}$$

5. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)

5.1 วิธีการ

5.1.1 อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง แล้วนำออกจากตู้อบไฟฟ้า ใส่ในโถดูดความชื้น จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

5.1.2 กระทำเช่นข้อ 1 ซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

5.1.3 ชั่งตัวอย่างอาหารที่ต้องการหาความชื้นให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1-3 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นซึ่งทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว จากนั้นนำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่งโมง จากนั้นนำใส่ในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมตัวอย่างนั้น จากนั้นนำเข้าตู้อบไฟฟ้าอีก และกระทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

5.2 การคำนวณ

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

ภาคผนวก ข
การตรวจวิเคราะห์ทางด้านกายภาพ

.

การวิเคราะห์ทางด้านกายภาพ

1. ความใส (Clarity) (AOAC, 2000)

โดยการวัดค่าการส่องผ่านแสง (% Tranmitance) ที่ความยาวคลื่น 639 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer

ค่าความใสเป็นคุณภาพที่แสดงให้เห็นทางกายภาพ สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าโดยจะหาได้จากการนำไซรัปมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 639 นาโนเมตร ดังนี้

1.1 เปิดเครื่องและทำการคาริเบรทเครื่องด้วยน้ำกลั่น ปรับศูนย์ของเครื่อง(Autozero)

1.2 เลือกความยาวคลื่นที่ 639 นาโนเมตร

1.3 เตรียมตัวอย่างโดยใช้คิวเวท ใส่สารตัวอย่างให้พอดีกับคิวเวท

1.4 นำตัวอย่างใส่เข้าเครื่องเพื่อทำการวัดค่า

1.5 บันทึกค่าที่ได้

2. ความหนืด (AOAC, 2000)

ความหนืดเป็นแรงต้านทานภายในของของเหลว ซึ่งเกิดจากแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลของของเหลวต้านทานต่อการไหล

การเตรียมและการวัดตัวอย่าง

2.1 ปรับระดับลูกน้ำ และปรับศูนย์ของเครื่อง(Autozero)

2.2 เตรียมตัวอย่างโดยใช้บีกเกอร์ ขนาด 500 มิลลิตร ใส่สารตัวอย่าง 500 มิลลิลิตร

2.3 เลือกเข็ม (Spindle) และความเร็ว (Speed)

2.4 ใส่เข็มเข้ากับตัวเครื่องวัดความหนืด

2.5 ปรับระดับเข็มให้จุ่มเข็มในตำแหน่งที่กำหนด

2.6 ใส่รหัสเข็ม (Speed) และความเร็วที่ใช้งาน

2.7 บันทึกค่าที่ได้โดยเลือกค่าที่ % Torque ได้ใกล้เคียง 100 % มากที่สุด

3. การวัดสีในระบบ CIE L* a* b* ด้วยเครื่อง Handy Colorimeter (AOAC, 2000)

3.1 การวัดตัวอย่างสีเหลือง นำตัวอย่างมาทำการตรวจวัดสีโดยใช้เครื่องวัด Handy Colorimeter โดยวัดในระบบ Hunter ซึ่งมีขั้นตอนในการวัดดังนี้

3.1.1 กดปุ่ม AVE

3.1.2 กดปุ่ม AVE พร้อมกับปุ่ม CAL หน้อจอจะปรากฏคำว่าขึ้น CALIBRATION

3.1.3 กดปุ่ม PRINT หน้าจอจะแสดงตัวเลขตามค่าสี การปรับมาตรฐานเครื่องโดยใช้แผ่นเทียบมาตรฐานสีขาวและสีเหลืองถ้าตัวเลขขึ้นไม่ตรงกับที่ต้องการ ให้ปรับขึ้น – ลงตามปุ่มลูกศร

3.1.4 กดปุ่ม PRINT หน้าจอจะแสดงคำว่า Read CAL BOARD

3.1.5 นำเครื่องไปวางบน BROAD แล้วกดปุ่มด้านหลัง 1 ครั้งหน้าจอจะแสดงค่า 0.00 ทุกค่า

3.1.6 นำตัวอย่างน้ำส้มสายชูที่ต้องการวิเคราะห์ใส่หลอดคิวเวท (Cuvette Tube) แล้วนำมาวัดค่าสี

3.1.7 นำเครื่อง Colorimeter วางบนฐาน แล้วกดปุ่มด้านหลัง 1 ครั้ง

3.1.8 บันทึกค่าที่อ่านได้

3.1.9 เมื่อใช้เสร็จ กดปุ่ม AVE ค้างจนกว่าจะขึ้น POWER OFF

3.2 แสดงผลในเทอมของตัวแปร 3 เทอม คือ L* a* และ b* แสดงผลดังนี้

ค่า L* (Lightness) หมายถึง ค่าความสว่างหรือความขาว

ค่า a* ที่เป็น + หมายถึง สีที่อยู่ภายใต้อิทธิพลของสีแดง

ค่า a* ที่เป็น - หมายถึง สีที่อยู่ภายใต้อิทธิพลของสีเขียว

ค่า b* ที่เป็น + หมายถึง สีที่อยู่ภายใต้อิทธิพลของสีเหลือง

ค่า b* ที่เป็น - หมายถึง สีที่อยู่ภายใต้อิทธิพลของสีน้ำเงิน

ภาคผนวก ค
การตรวจวิเคราะห์ทางด้านจุลินทรีย์

การวิเคราะห์ทางด้านจุลินทรีย์

1. การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total bacterial count) (AOAC, 2000)

1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar จำนวน 23.5 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร ละลายด้วยการต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อใส แล้วนำไปผ่านการฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.2 การวิเคราะห์วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม เติมสารละลายเปบโตน 0.1 % จำนวน 225 มิลลิลิตร จะได้ความเจือจางของอาหารเป็น 1 : 10 แล้วทำตัวอย่างให้เจือจางระดับที่ต้องการในสารละลายเปบโตน 0.1 % ในหลอดแก้วปริมาณ 0.9 มิลลิลิตร

ใช้ปิเปตฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายตัวอย่างความเข้มข้นที่เหมาะสมจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว โดยทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) ที่หลอมละลายและยังอุ่นอยู่ประมาณ 15 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเชื้อ เขย่าจานให้สารละลายกระจายตัวไปทั่วๆ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวแล้วนำไปบ่มที่ตู้เพาะเชื้อในลักษณะคว่ำจาน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยเลือกจานที่มีโคโลนี 30-300 โคโลนี

2. การวิเคราะห์จำนวนยีสต์และรา (AOAC, 2000)

2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar จำนวน 39.0 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร ละลายด้วยการต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อใส นำไปผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปรับ pH ด้วย Tartaric acid 14 มิลลิลิตร ขณะอาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส

2.2 การวิเคราะห์วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

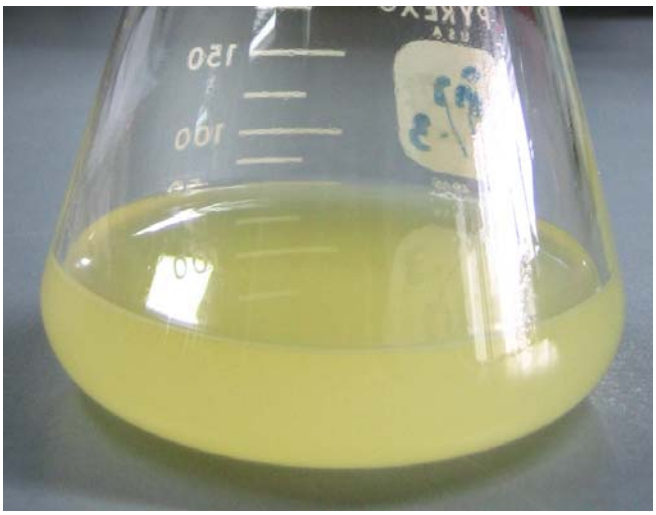
ใช้ปิเปตฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายตัวอย่างความเข้มข้นที่เหมาะสมจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในการเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ที่หลอมละลายและยังอุ่นอยู่ประมาณ 15 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเชื้อ เขย่าจานให้สารละลายกระจายตัวไปทั่ว ๆ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว แล้ว

นำไปบ่มที่ตู้เพาะเชื้อในลักษณะหงายจาน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นับจำนวนยีสต์และราทั้งหมด

ภาคผนวก ง
ภาพตัวอย่างของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์

ภาพผนวกที่ ง1 ข้าวหอมมะลิที่ใช้ในการผลิตไซรัป

ภาพผนวกที่ ง2 โคจิข้าวของเชื้อรา *Amylomyces* spp. CM 105 ที่ใช้ในการหมัก



<u>ภาพผนวกที่ ง3</u> น้ำเชื่อมข้าวที่ได้จากการย่อยข้าวด้วยเชื้อรา *Amylomyces* spp. CM 105