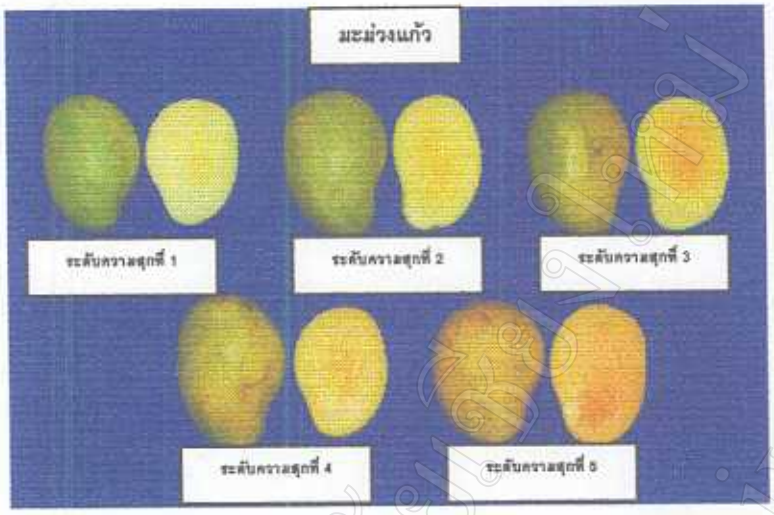
ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

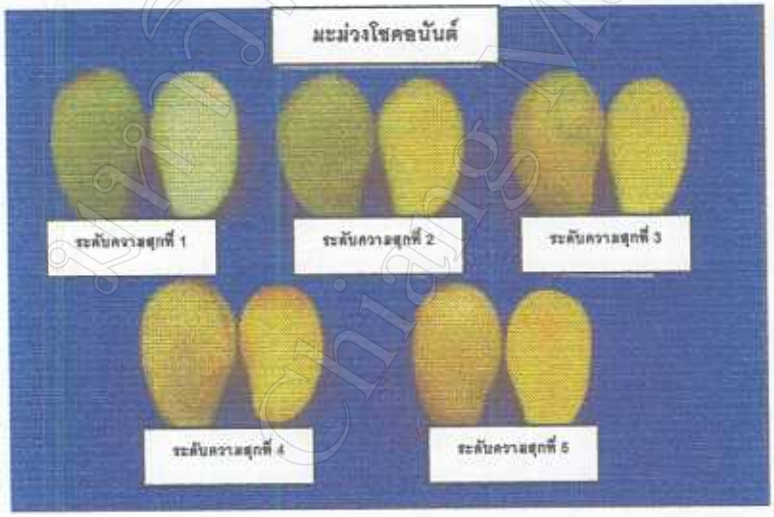
ภาคผนวก ก.

รูปภาพประกอบ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



ภาพ ก-1 : มะม่วงแก้ว (*Mangifera indica*, L. var ' Kaew ') ที่มีความสุกต่างกัน 5 ระดับ



ภาพ ก-2 : มะม่วงโชคอนันต์ (*Mangifera indica*, L. var ' Choke anan ') ที่มีความสุกต่างกัน 5 ระดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาพ ก-3 : ใบมินต์ (*Mentha piperita.*)

ภาพ ก-4 : ดอกคาโมมายล์ (*Marticaria recutita.*)

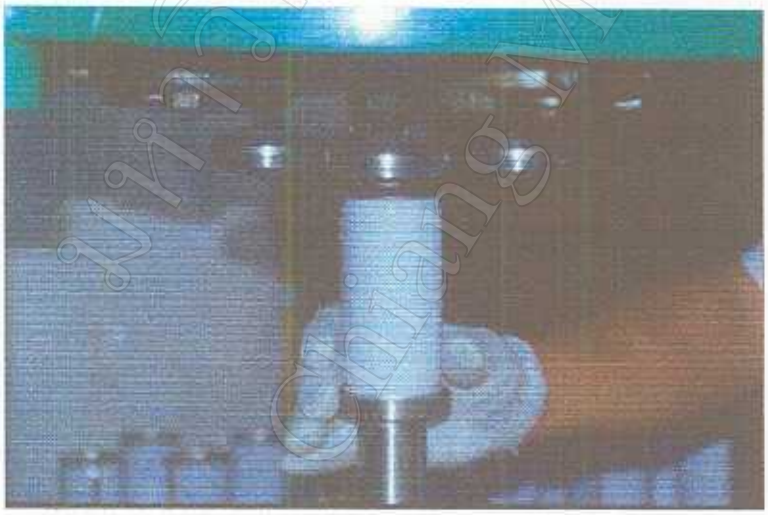
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาพ ก-5 : น้ำสมุนไพรผสมที่เตรียมจากน้ำชะเอม น้ำมินต์ และน้ำคาโมมายล์

ภาพ ก-6 : ส่วนประกอบของเนคต้ามะม่วงผสมสมุนไพร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University

ภาพ ก-7 : เครื่อง Homogenizer



ภาพ ก-8 : การปิดฝากระป๋อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาพ ก-9 : ผลิตภัณฑ์เนคต้ามะม่วงผสมสมุนไพร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาคผนวก ข.

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

แบบทดสอบเค้าโครงผลิตภัณฑ์
ผลิตภัณฑ์ เนคต้ามะม่วงผสมสมุนไพร

ผลิตภัณฑ์เป็นเครื่องดื่มน้ำมะม่วงชนิดขุ่นที่ประกอบด้วย pulp มะม่วงอย่างน้อยร้อยละ 30 และผสมน้ำสมุนไพรสกัดจากชะเอม มินต์ และคาโมมายล์ มีการปรุงแต่งรสด้วยน้ำตาล กรดซิตริก และเกลือ

กรุณากรอกแบบสอบถามให้ตรงกับความต้องการของท่าน โดย

1. ระบุหัวข้อ " ลักษณะผลิตภัณฑ์" ที่ท่านเห็นว่าสำคัญสำหรับผลิตภัณฑ์ลงไปในแต่ละหัวข้อ
2. กำหนดเครื่องหมาย | ลงบนสเกลในตำแหน่งที่คิดว่าเป็นลักษณะที่ดีที่สุดของผลิตภัณฑ์ในอุดมคติ
3. กำหนดเครื่องหมาย X ลงบนสเกลในตำแหน่งที่คิดว่าเป็นลักษณะของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง

ชื่อผู้ทดสอบชิม.....วันที่.....

ลักษณะปรากฏภายนอก

..... ——————————————————————— .....
....
..... ——————————————————————— .....
....
..... ——————————————————————— .....
....
..... ——————————————————————— .....
....

กลิ่นและรสชาติ

..... ——————————————————————— .....
....
..... ——————————————————————— .....
....
..... ——————————————————————— .....
....
..... ——————————————————————— .....
....

ขอบคุณที่กรุณาให้ความร่วมมือ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส
ผลิตภัณฑ์ เนคต้ามะม่วงผสมสมุนไพร

ชื่อผู้ทดสอบชิม.....วันที่.....

กรุณากำหนดเครื่องหมาย X ในตำแหน่งที่ท่านคิดว่าเป็นระดับของลักษณะนั้นของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง และกำหนดให้เครื่องหมาย | เป็นระดับในอุดมคติของลักษณะนั้นที่ท่านต้องการ

ลักษณะปรากฏ

สีปรากฏ :

ความคงตัว

กลิ่นและรสชาติ

รสเปรี้ยว

รสหวาน

กลิ่นมะม่วง

กลิ่นรสสมุนไพร

ลักษณะเนื้อสัมผัส

ความข้นหนืด

การยอมรับโดยรวม

ขอบคุณที่กรุณาให้ความร่วมมือ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ภาคผนวก ค.

วิธีวิเคราะห์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

การวิเคราะห์คุณภาพด้านกายภาพ

การวิเคราะห์ค่าแรงเฉือน (Shear force) ตามวิธีของ Instron Coperation (1993)

การเตรียมตัวอย่าง

นำผลมะม่วงที่ปอกเปลือกแล้ว ตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด กว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 1x2x1 เซนติเมตร จากนั้นนำไปวัดค่าแรงเฉือน

วิธีวิเคราะห์

นำตัวอย่างที่เตรียมไว้มาวัดค่าแรงเฉือนด้วยเครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส Instron: Model 5565 โดยติดตั้งอุปกรณ์แบบใบมีดตัด และกำหนดอัตราเร็วของใบมีดเท่ากับ 200 มิลลิเมตรต่อนาที ระยะทางในการเคลื่อนที่ลงทั้งหมดเท่ากับ 1 เซนติเมตร และมีแรงกระทบกลับร้อยละ 60 บันทึกค่า Shear peak load (Newton) ที่วัดได้จากการตัดชิ้นตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

การวิเคราะห์ค่าสีในระบบ Hunter ตามวิธีของ Minolta Camera Co., Ltd.(1991)

การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่เป็นเนื้อมะม่วงมาปั่นด้วยเครื่องปั่นผสม Blender: National MX-T31 GN ที่ความเร็วระดับ 5 เป็นเวลา 1 นาที จนได้น้ำมะม่วงที่มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปวัดค่าสีอย่างรวดเร็วทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงการเปลี่ยนสีของตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างที่เป็นน้ำมะม่วงสามารถนำมาวิเคราะห์ได้ทันที

วิธีวิเคราะห์

ทำการปรับเทียบมาตรฐานของเครื่องวัดสี (Calibration) โดยใช้แผ่นสีขาวมาตรฐาน (White blank ; L=97.69, a=-0.18 และ b=1.84) จากนั้นจึงนำตัวอย่างปริมาณ 50 มิลลิลิตร เทลงในภาชนะสีขาวแล้ววัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสี Minolta Camera: Model CR 300 บันทึกค่าสีในระบบ Hunter ซึ่งค่าที่วัดได้จะอยู่ในหน่วย L ,a และ b มีความหมายดังนี้

ค่าสี L หมายถึงค่าความสว่าง (Lightness) มีช่วงตั้งแต่ 0 (สีดำ) จนถึง 100 (สีขาว)
ค่าสี a เมื่อมีค่าเป็นลบหมายถึงสีเขียว ถ้าเป็นบวกหมายถึงสีแดง
ค่าสี b เมื่อมีค่าเป็นลบหมายถึงสีน้ำเงิน ถ้าเป็นบวกหมายถึงสีเหลือง
แต่ละตัวอย่างจะทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3-5 ครั้ง จากนั้นจึงนำมาหาค่าเฉลี่ย

การวิเคราะห์ค่าความหนืด (Viscosity) ตามวิธีของ Brookfield

การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างน้ำมะม่วงมาปรับอุณหภูมิให้เท่ากับ 25องศาเซลเซียส ก่อนการวัด

วิธีวิเคราะห์

นำตัวอย่างน้ำมะม่วงปริมาณ 300 มิลลิลิตร บรรจุในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร ปรับอุณหภูมิให้เท่ากับ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวัดความหนืดด้วยเครื่อง Brookfield viscometer โดยใช้เข็มวัด spindle เบอร์1, 2 หรือ 3 ด้วยอัตราเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที และเวลาในการวัด 1.5 นาที ทั้งนี้จะต้องอ่านค่า %Torque ให้ได้ระหว่าง 10-100 บันทึกค่าความหนืดมีหน่วยเป็นเซนติพอยส์ (Centipoise) โดยแต่ละตัวอย่างจะทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นจึงนำมาหาค่าเฉลี่ย

การวิเคราะห์คุณภาพด้านเคมี

การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์

นำตัวอย่างเนื้อมะม่วงที่ทราบน้ำหนักเริ่มต้นมาคั้นน้ำและแยกกากออกด้วยเครื่องคั้นน้ำผลไม้แบบแยกกาก Juicer: National, model MJ-68M บันทึกปริมาตรและชั่งน้ำหนักน้ำมะม่วงที่คั้นได้จากนั้นนำไปวิเคราะห์คุณภาพด้านเคมี สำหรับตัวอย่างที่เป็นน้ำมะม่วงสามารถนำมาวิเคราะห์ได้ทันที ตัวอย่างที่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ทันสามารถเก็บในขวดทึบแสงมีฝาปิดและเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส เมื่อจะนำออกมาทำการวิเคราะห์ต้องทำละลายน้ำแข็งจนหมดก่อน ทั้งนี้ยกเว้นการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีจะต้องใช้ตัวอย่างที่เตรียมขึ้นใหม่เท่านั้น

การวิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ตามวิธีของ International Federation of Fruit Juice Producer (1962)

วิธีวิเคราะห์

ทำการปรับเทียบมาตรฐาน (Calibration) เครื่อง pH-meter: Horiba Model D-12E 526002 ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานที่มีความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.00 และ 7.00 ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยแต่ละตัวอย่างจะทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้งแล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ย

การวิเคราะห์ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ทั้งหมด (Titratable acidity) **ตามวิธีของ** International Federation of Fruit Juice Producer (1962)

การเตรียมสารเคมี

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล โดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาณ 4 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาปรับเทียบมาตรฐาน (Standardization) โดยไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานของกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล โดยใช้ฟีนอล์ฟธาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

วิธีวิเคราะห์

1. ปิเปตตัวอย่างมาครั้งละ 10 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นจำนวน 50 มิลลิลิตร

2. นำไปไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ระหว่างการไตเตรททำการกวนผสมตัวอย่างตลอดเวลาโดยใส่แท่งแม่เหล็ก (Magnetic bar) ในบีกเกอร์ตัวอย่างแล้วนำไปวางบนเครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic stirrer) พร้อมทั้งจุ่มอีเลคโทรดของเครื่อง pH-meter เพื่อวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างด้วย

3. ไตเตรทจนกระทั่งถึงจุดยุติที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.00 (สำหรับคำนวณเทียบเป็นกรดทาร์ทาริก) และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.10 (สำหรับคำนวณเทียบเป็นกรดซิตริก) บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรทเพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดทาร์ทาริกและกรดซิตริก โดยแต่ละตัวอย่างจะทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้งและนำมาหาค่าเฉลี่ย

การคำนวณ

ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (กรัมต่อร้อยมิลลิลิตรของตัวอย่าง) คำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณกรดซิตริก} = \frac{\text{ml. NaOH} \times \text{n.NaOH} \times \text{meq. Citric acid} \times 100}{\text{ml.Sample}}$$

$$\text{ปริมาณกรดทาร์ทาริก} = \frac{\text{ml. NaOH} \times \text{n.NaOH} \times \text{meq. Tartaric acid} \times 100}{\text{ml.Sample}}$$

เมื่อ ml. NaOH คือ ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรทจนถึงจุดยุติ หน่วยเป็นมิลลิลิตร

n.NaOH คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรท หน่วยเป็นนอร์มอล

meq. Citric acid คือ มิลลิสมมูลย์ของกรดซิตริก มีค่าเท่ากับ 0.064 กรัม

meq. Tartaric acid คือ มิลลิสมมูลย์ของกรดทาร์ทาริกมีค่าเท่ากับ0.075 กรัม

ml. Sample คือ ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ หน่วยเป็นมิลลิลิตร

การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solid) **ตามวิธีของ** International Federation of Fruit Juice Producer (1991)

วิธีวิเคราะห์

นำตัวอย่างมาวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ด้วยเครื่อง Hand refractometer Atago : Model N1 ซึ่งมีช่วงค่าอยู่ระหว่าง 1-32 องศาบริกซ์ โดยต้องทำการปรับเทียบมาตรฐาน (Calibration) ด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับให้เครื่องอ่านค่าได้เท่ากับ 0 ก่อนการวัด บันทึกค่าที่อ่านได้จากการวัดตัวอย่าง จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดโดยอ้างอิงกับปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ในตัวอย่างนั้น ตามตาราง ค-1.

การคำนวณ

ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในตัวอย่างประกอบด้วย น้ำตาล กรด และตัวถูกละลายอื่นๆ สามารถคำนวณได้จากค่าที่อ่านได้จากเครื่อง Hand refractometer และปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ดังต่อไปนี้

ถ้าตัวอย่างมีปริมาณกรดซิตริก 0.23 กรัมต่อ 100 กรัม เมื่อนำไปเทียบกับตาราง ค-1 . และคำนวณด้วยวิธี Interpolation จะได้ค่าปรับเท่ากับ 0.046 เมื่ออ่านค่าจาก Hand refractometer ได้เท่ากับ 15.0 องศาบริกซ์ ดังนั้นค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดจะคำนวณได้เท่ากับ 15.0+0.046 = 15.046 องศาบริกซ์

ตาราง ค-1 : ค่าปรับ (Corrective factor) สำหรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด

ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (กรัมต่อร้อยกรัม)	**ค่าปรับ** (Corrective factor)
0.2	0.04
0.4	0.08
0.6	0.12
0.8	0.16
1.0	0.20
1.2	0.24
1.4	0.28

ตาราง ค-1: (ต่อ)

1.6	0.32
1.8	0.36
2.0	0.39
2.2	0.43
2.4	0.47
2.6	0.51
2.8	0.55
3.0	0.58
3.2	0.62
3.4	0.66
3.6	0.70
3.8	0.74
40	0.78

ที่มา : International Federal of Fruit Juice Producer (1991)

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส ดี-กลูโคส และดี-ฟรุคโตส โดยใช้ชุดทดสอบเอนไซม์ (Enzymatic Test Kit) **ตามวิธีของ** Boehringer Mannheim (1998)

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมสารเคมีในชุดทดสอบเอนไซม์ ดังต่อไปนี้

- **สารละลายขวดที่** 1 ประกอบด้วย Citrate buffer ค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 4.6 เอนไซม์ β- fructosidase 720 U โดยประมาณ และสารเสริมความคงตัว เติมน้ำกลั่นปริมาณ 10 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิให้มีอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส
- **สารละลายขวดที่** 2 ประกอบด้วย Triethanolamine buffer ค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7.6 NADP 110 มิลลิกรัมโดยประมาณ ATP 260 มิลลิกรัมโดยประมาณ

แมกนีเซียมซัลเฟต และสารเสริมความคงตัว เติมน้ำกลั่นปริมาณ 45 มิลลิลิตรลงในขวดแล้วเขย่าให้เข้ากัน

- **สารละลายขวดที่ 3** ประกอบด้วย เอนไซม์ Hexokinase 320 U โดยประมาณ และเอนไซม์ Phosphate dehydrogenase 160 U โดยประมาณ
- **สารละลายขวดที่ 4** ประกอบด้วย เอนไซม์ Phosphoglucose isomerase 420 U โดยประมาณ

2. ทำการเจือจางตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ โดยปิเปตตัวอย่างปริมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นและปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ตัวอย่างที่ได้นี้จะมีค่า Dilution factor เท่ากับ 100 จากนั้นดำเนินการวิเคราะห์ตามขั้นตอนดังนี้

ตาราง ค-2 : วิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโดยชุดทดสอบเอนไซม์

สาระลายที่ปิเปตใส่ใน cuvette	**Blank ในชุดวิเคราะห์ซูโครส**	**ตัวอย่างในชุดวิเคราะห์ซูโครส**	**Blank ในชุดวิเคราะห์กลูโคสและฟรุคโตส**	**ตัวอย่างในชุดวิเคราะห์กลูโคสและฟรุคโตส**
สารละลายขวดที่ 1	0.2 มิลลิลิตร	0.2 มิลลิลิตร	-	-
ตัวอย่างวิเคราะห์	-	0.1 มิลลิลิตร	-	0.2 มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Plastic spatula แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส				
สารละลายขวดที่ 2	1.0 มิลลิลิตร	1.0 มิลลิลิตร	1.0 มิลลิลิตร	1.0 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.8 มิลลิลิตร	1.7 มิลลิลิตร	2.0 มิลลิลิตร	1.9 มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Plastic spatula แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร บันทึกค่านี้เป็นค่า (A1)				
สารละลายขวดที่ 3	0.02 มิลลิลิตร	0.02 มิลลิลิตร	0.02 มิลลิลิตร	0.02 มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Plastic spatula แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร บันทึกค่านี้เป็นค่า (A2)				
สารละลายขวดที่ 4	-	-	0.02 มิลลิลิตร	0.02 มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Plastic spatula แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร บันทึกค่านี้เป็นค่า (A3)				

การคำนวณ

ปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดในตัวอย่าง คำนวณได้จากค่าการดูดกลืนแสง ΔA ดังนี้

$$\Delta A = (A2\text{-}A1)_{Sample} - (A2\text{-}A1)_{Blank}$$

$$\Delta A_{\text{น้ำตาลกลูโคสทั้งหมด}} = (A2\text{-}A1)_{\text{ตัวอย่างชุดวิเคราะห์ซูโครส}} - (A2\text{-}A1)_{Blank}$$

$$\Delta A_{\text{น้ำตาลกลูโคส}} = (A2\text{-}A1)_{\text{ตัวอย่างชุดวิเคราะห์กลูโคส}} - (A2\text{-}A1)_{Blank}$$

$$\Delta A_{\text{น้ำตาลซูโครส}} = \Delta A_{\text{น้ำตาลกลูโคสทั้งหมด}} - \Delta A_{\text{น้ำตาลกลูโคส}}$$

ทำการคำนวณปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิด(กรัมต่อ100กรัมของตัวอย่าง) ดังต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณน้ำตาลกลูโคส} = \frac{5.441}{6.3} \times \Delta A_{\text{น้ำตาลกลูโคส}} \times 100$$

$$\text{ปริมาณน้ำตาลฟรุคโตส} = \frac{5.477}{6.3} \times \Delta A_{\text{น้ำตาลฟรุคโตส}} \times 100$$

$$\text{ปริมาณน้ำตาลซูโครส} = \frac{10.34}{6.3} \times \Delta A_{\text{น้ำตาลซูโครส}} \times 100$$

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ AOAC (1995)

การเตรียมสารเคมี

- เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณ 50 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร
- เตรียมสารละลายกรดบอริก ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยชั่งกรดบอริกปริมาณ 2 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร
- สารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐานความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

- เตรียมสารละลายเมธิลเรดอินดิเคเตอร์ โดยชั่งเมธิลเรดปริมาณ 0.016 กรัม และ บรอมโมครีซอลกรีน ปริมาณ 0.083 กรัมละลายและปรับปริมาตรด้วยเอธานอลให้ได้ 100 มิลลิลิตร
- เตรียมคะตะลิสต์ผสม (Catalyst mixture) โดยชั่งโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำปริมาณ 96 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟต ปริมาณ 3.5 กรัม และเซเลเนี่ยมไดออกไซด์ ปริมาณ 0.5 กรัม ผสมให้เข้ากัน

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างที่เตรียมได้ครั้งละประมาณ 5 กรัมโดยต้องทราบน้ำหนักที่แท้จริง ใส่ใน Kjeldahl digestion flask พร้อมด้วยคะตะลิสต์ผสม 8 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาณ 20 มิลลิลิตร นำไปย่อยด้วยความร้อนโดยใช้เครื่องย่อยโปรตีน (Digester: Buchi Model 323, Switzerland) ทำการย่อยตัวอย่างจนได้สารละลายใส

2. ตั้งทิ้งไว้จนเย็นและไม่มีไอระเหยของกรด จากนั้นนำ Kjeldahl digestion flask ไปต่อกับเครื่องกลั่นโปรตีน (Distillation unit : Buchi Model 323, Switzerland) นำฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตรที่บรรจุสารละลายกรดบอริกปริมาณ 50 มิลลิตร และเมธิลเรด 2-3 หยดเพื่อใช้เป็นอินดิเคเตอร์มารองรับปลาย Condenser โดยให้ปลาย Condensor จุ่มอยู่ต่ำกว่าระดับของสารละลาย

3. เติมน้ำกลั่นปริมาณ 125 มิลลิลิตรลงใน Kjeldahl digestion flask จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาณ 75 มิลลิลิตร จากนั้นจึงทำการกลั่นด้วยความร้อน จะได้ของเหลวที่ควบแน่นลงมาทาง Condenser อย่างน้อย 300 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นชะปลาย Condenser ลงมาในฟลาสก์ และนำสารละลายทั้งหมดไปไตเตรทกับสารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐานความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ จนถึงจุดยุติที่สารละลายเป็นสีส้มแดง

4. บันทึกปริมาณสารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐานที่ใช้ในการไตเตรท นำไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Crude protein)

5. การวิเคราะห์ Blank ทำโดยวิธีเดียวกันกับตัวอย่าง แต่ใช้เพียงคะตะลิสก์ผสมกับกรดซัลฟูริกเข้มข้นเท่านั้น ในการไตเตรท Blank จะใช้สารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐานความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ไม่เกิน 0.5 มิลลิลิตร

การคำนวณ

ปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง (กรัมต่อร้อยกรัมตัวอย่าง) คำนวณได้จาก

$$= \frac{(\text{ml.}H_2SO_{4\ \text{Sample}} - \text{ml. }H_2SO_{4\ \text{Blank}}) \times \text{conc.}H_2SO_4 \times 0.014 \times 6.25 \times 100}{\text{g. Sample}}$$

เมื่อ $\text{ml.}H_2SO_{4\ \text{Sample}}$ คือ ปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐานที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง หน่วยเป็นมิลลิลิตร

$\text{ml. }H_2SO_{4\ \text{Blank}}$ คือ ปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐานที่ใช้ในการไตเตรท Blank หน่วยเป็นมิลลิลิตร

$\text{conc.}H_2SO_4$ คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานของกรดซัลฟูริกที่ใช้ในการไตเตรท หน่วยเป็นโมลาร์

g. Sample คือ น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ หน่วยเป็นกรัม

การวิเคราะห์ปริมาณเพคติน ในรูปของเพคตินที่ละลายได้ในน้ำ (Water soluble pectin) **เพคตินที่ละลายได้ในแอมโมเนียมออกซาเลต** (Ammonium-oxalate soluble pectin) **เพคตินที่ละลายได้ในด่าง** (Alkaline soluble pectin) **และปริมาณเพคตินทั้งหมด** (Total pectin) **ตามวิธีของ** International Federation of Fruit Juice Producer (1964)

การเตรียมสารเคมี

- เอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 (Absolute ethanol)
- เตรียมสารละลายเอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 63 โดยตวง Absolute ethanol ปริมาณ 65 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร
- เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณ 4 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร
- เตรียมสารละลายแอมโมเนียมออกซาเลต ความเข้มข้นร้อยละ 0.75 โดยชั่งแอมโมเนียมออกซาเลตจำนวน 0.75 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร
- สารละลาย Anti-foaming agent

- เตรียมสารละลาย Alcohol carbazole ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยชั่ง Carbazole ปริมาณ 0.1 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเอธานอลให้ครบ 100 มิลลิลิตร โดยเตรียมขึ้นมาใหม่ทุกครั้งเพื่อใช้ในการวิเคราะห์

การแยกตะกอนสารประกอบเพคตินทั้งหมด (Crude pectin)

1. ปิเปตตัวอย่างมาครั้งละ 15 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วหยดสารละลาย Anti-foaming agent 1-2 หยด

2. เติมเอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ที่มีอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ปริมาณ 25 มิลลิลิตรใส่ในหลอด Centrifuge คนให้เข้ากันด้วยเครื่องแก้ว จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ระหว่างนั้นใช้แท่งแก้วคนบางครั้ง เมื่อครบเวลานำหลอด Centrifuge ขึ้นล้างแท่งแก้วคนด้วยเอธานอลอีก 10 มิลลิลิตร

3. นำหลอด Centrifuge มาแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง โดยใช้อัตราเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นค่อยๆ เทส่วนของเหลวทิ้งไป นำตะกอนที่ได้มาทำการสกัดต่อ

4. ทำการสกัดซ้ำตามขั้นตอนข้อ 2 และ 3 โดยเติมเอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 63 ที่มีอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ครั้งละ 40 มิลลิลิตร ทำการสกัดเช่นนี้ 2 ครั้ง ตะกอนที่ได้เป็นตะกอนของสารประกอบเพคติน

การแยกสารประกอบเพคตินที่ละลายน้ำ (Water soluble pectin)

1.นำตะกอนของสารประกอบเพคตินที่แยกได้ตามวิธีการข้างต้น มาเติมน้ำกลั่นปริมาณ 35 มิลลิลิตร คนตะกอนให้เข้ากันด้วยแท่งกวนแม่เหล็กไฟฟ้า เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง โดยใช้อัตราเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที

2. แยกของเหลวชั้นบนไว้ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำตะกอนมาสกัดซ้ำด้วยน้ำกลั่นและแยกตะกอนตามขั้นตอนข้อ 1 อีกครั้ง

3.รวมของเหลวที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 ครั้งเข้าด้วยกันแล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้นำไปวิเคราะห์ปริมาณเพคตินที่ละลายน้ำ (Water soluble pectin) ตะกอนที่เหลือนำไปสกัดเอาเพคตินที่ละลายในแอมโมเนียมออกซาเลตต่อไป

การแยกสารประกอบเพคตินที่ละลายในแอมโมเนียมออกซาเลต (Ammonium-oxalate soluble pectin)

1. นำตะกอนมาเติมสารละลายแอมโมเนียมออกซาเลต ปริมาณ 35 มิลลิลิตร คนตะกอนให้เข้ากันด้วยแท่งกวนแม่เหล็กไฟฟ้า เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง โดยใช้อัตราเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที

2. แยกของเหลวชั้นบนไว้ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำตะกอนมาสกัดซ้ำด้วยสารละลายแอมโมเนียมออกซาเลตและแยกตะกอนตามขั้นตอนข้อ 1 อีกครั้ง

3.รวมของเหลวที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 ครั้งเข้าด้วยกัน แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้นำไปวิเคราะห์ปริมาณเพคตินที่ละลายในแอมโมเนียมออกซาเลต (Ammonium-oxalate soluble pectin) ส่วนตะกอนที่เหลือนำไปสกัดเอาเพคตินที่ละลายในด่างต่อไป

การแยกสารประกอบเพคตินที่ละลายในด่าง (Alkaline-soluble pectin)

1. นำตะกอนมาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาณ 35 มิลลิลิตร คนตะกอนให้เข้ากันด้วยแท่งกวนแม่เหล็กไฟฟ้า เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง โดยใช้อัตราเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที

2. แยกของเหลวชั้นบนไว้ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำตะกอนมาสกัดซ้ำด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และแยกตะกอนตามขั้นตอนข้อ 1 อีกครั้ง

3. รวมของเหลวที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 ครั้งเข้าด้วยกันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาทีจากนั้นกรองตะกอนออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 นำของเหลวที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณเพคตินที่ละลายในด่าง

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณเพคติน

นำสารละลายเพคตินที่ละลายในน้ำ เพคตินที่ละลายในแอมโมเนียมออกซาเลต และเพคตินที่ละลายในด่าง ซึ่งสกัดได้ตามวิธีการขั้นต้นมาวิเคราะห์ปริมาณเพคติน ตามขั้นตอนดังนี้

1. ใช้หลอดทดลองขนาดใหญ่เตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ต่อไปนี้

ตาราง ค-3 : การเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์ปริมาณเพคติน

หลอดทดลอง	สารเคมี
A	เติมสารละลายเพคตินที่เตรียมได้ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และ สารละลาย Alcohol-carbazole 0.5 มิลลิลิตร
B	เติมสารละลายเพคตินที่เตรียมได้ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และ เอธานอล 0.5 มิลลิลิตร
C	เติมน้ำกลั่นปริมาณ 1 มิลลิลิตร และ สารละลาย Alcohol-carbazole 0.5 มิลลิลิตร
D	เติมน้ำกลั่นปริมาณ 1 มิลลิลิตร และ สารละลาย Alcohol-carbazole 0.5 มิลลิลิตร

2. หลังจากเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์เรียบร้อยแล้ว เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาณ 6 มิลลิลิตร โดยใช้สูบชักดูดสาร (Dispensette) ค่อยๆกดปล่อยกรดซัลฟูริกลงมาตามข้างหลอดช้าๆ แต่ให้หมดภายใน 7 วินาที

3. ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเหวี่ยงผสม (Vortex) จากนั้นนำหลอดทดลองไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดขึ้นทิ้งให้เย็นประมาณ 15 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนคลื่นแสง เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบเพคตินที่มีในตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของ Galacturonic acid monohydrate

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. เตรียม Stock solution ของสารละลาย Galacturonic acid monohydrate โดยชั่ง Galacturonic acid monohydrate ปริมาณ 120.5 มิลลิกรัม แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้เกิดการขยายตัวของสายโมเลกุล Galacturonic acid monohydrate สารละลายที่เตรียมได้นี้มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. เจือจาง Stock solution ของสารละลาย Galacturonic acid monohydrate ตามข้อ 1. ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10,20,40,50,60 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปต Stock solution มาครั้งละ 10,20,40,50,60 และ 80 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

3. เตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเพคตินเช่นเดียวกับในตัวอย่าง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงเช่นเดียวกัน

4.นำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลาย Galacturonic acid monohydrate ที่ความเข้มข้นต่างๆมาหาความสัมพันธ์เชิงเส้นทำให้ได้สมการเส้นตรงและนำมาใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารประกอบเพคตินที่มีในตัวอย่าง

การคำนวณ

สมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน $y= a(x)+b$

เมื่อ y คือ ปริมาณสารประกอบเพคติน มีหน่วยเป็น ไมโครกรัมต่อลิตร

a คือ ค่าความชันของเส้นกราฟ

x คือ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลายมาตรฐานหลังจากหักลบด้วย Blank แล้ว หรือเขียนได้ว่า

x = (ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดทดลอง A – ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดทดลอง B - ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดทดลอง C-ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดทดลอง D)

b คือ ค่าคงที่ของสมการ

คำนวณค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของตัวอย่างเช่นเดียวกับของสารละลายมาตรฐาน ทำให้ได้ค่า x นำไปแทนในสมการข้างต้นเพื่อคำนวณหาปริมาณสารประกอบเพคตินที่มีในตัวอย่างวิเคราะห์ ซึ่งจำเป็นต้องนำมาคำนวณให้อยู่ในหน่วย มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของตัวอย่างเริ่มต้นดังนี้

ปริมาณสารประกอบเพคตินในตัวอย่างวิเคราะห์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

$$= \frac{\text{ปริมาณสารประกอบเพคตินที่เทียบจากกราฟมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อลิตร)} \times 100}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง เท่ากับ 15 มิลลิลิตร}}$$

ปริมาณสารประกอบเพคตินในตัวอย่างเนื้อมะม่วง (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม)

$$= \frac{\text{ปริมาณสารประกอบเพคติน (มิลลิกรัมต่อลิตร) x น้ำหนักของน้ำมะม่วงที่คั้นได้ (กรัม)}}{\text{ความหนาแน่นของน้ำมะม่วง(กรัมต่อมิลลิลิตร)xน้ำหนักเนื้อมะม่วง(กรัม)xDilution factor}}$$

เมื่อ ความหนาแน่นของน้ำมะม่วง

= น้ำหนักของน้ำมะม่วง (กรัม) / ปริมาตรของน้ำมะม่วง (มิลลิลิตร)

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี (L-ascorbic acid) **โดยใช้ชุดทดสอบเอนไซม์** (Enzymatic test kit) **ตามวิธีของ** Boehringer Mannheim (1997)

การเตรียมสารเคมี

- สารละลายขวดที่ 1 ประกอบด้วย Sodiumphosphate / Citrate buffer ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ3.5 MTT [3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] และสารเสริมความคงตัว นำมาแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิให้มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนใช้งาน
- สารละลายขวดที่ 2 ประกอบด้วย PMS (5-methylphenazinium methosulfate)
- Ascorbic oxidase spatulas ประกอบด้วย เอนไซม์แอสคอร์บิกออกซิเดสประมาณ 17 U
- เตรียมสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยชั่งกรดเมตาฟอสฟอริก ปริมาณ 1 กรัม ทำละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

ปิเปตตัวอย่างมาครั้งละ 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 1 และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ดังนั้นตัวอย่างวิเคราะห์จะมี Dilution factor เท่ากับ 10 จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีตามขั้นตอนดังนี้

ตาราง ค-4 : วิธีวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีโดยชุดทดสอบเอนไซม์

สารละลายที่ปิเปต ลงใน cuvette	Blank	**ตัวอย่าง**
สารละลายขวดที่ 1	1 มิลลิลิตร	1 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.5 มิลลิลิตร	1.5 มิลลิลิตร
ตัวอย่างวิเคราะห์	0.1 มิลลิลิตร	0.1 มิลลิลิตร
Ascorbic osidase spatula	1 ชิ้น	-
คนผสมให้เข้ากันโดยใช้ plastic spatula แล้วนำไปตั้งในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที ในระหว่างนี้ทำการคน Blank cuvette ทุก 2 นาที เมื่อครบเวลานำ Ascorbic oxsidase spatula ออกแล้วนำ cuvette ทั้งหมดไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 578 นาโนเมตร **บันทึกเป็นค่า A1**		
สารละลายขวดที่ 2	0.1 มิลลิลิตร	0.1 มิลลิลิตร
ในขั้นตอนนี้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะมีความไวต่อแสงมาก จึงต้องระวังไม่ให้ cuvette สัมผัสกับแสง คนผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้ plastic spatula แล้วนำไปตั้งในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 578 นาโนเมตร **บันทึกเป็นค่า A2**		

การคำนวณ

ปริมาณวิตามินซีในตัวอย่าง คำนวณได้จากค่าการดูดกลืนแสง ΔA ดังนี้

$$\Delta A = (A2-A1)_{Sample} - (A2-A1)_{Blank}$$

ปริมาณวิตามินซีในตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อลิตร) $= 0.2818 \times \Delta A \times$ Dilution factor

ปริมาณวิตามินซีในตัวอย่าง (กรัมต่อ 100กรัม)

$$= \frac{\text{ปริมาณวิตามินซีในตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อลิตร)} \times \text{น้ำหนักของน้ำมะม่วงที่คั้นได้(กรัม)}}{\text{ความหนาแน่นของน้ำมะม่วง (กรัมต่อมิลลิลิตร)} \times \text{น้ำหนักของมะม่วง(กรัม)}}$$

เมื่อ ความหนาแน่นของน้ำมะม่วง

= น้ำหนักของน้ำมะม่วง (กรัม) / ปริมาตรของน้ำมะม่วง (มิลลิลิตร)

การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าทั้งหมด (Total ash) **ตามวิธีของ** AOAC (1995)

วิธีวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างน้ำมะม่วงให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนปริมาณ 3-5 กรัม ใส่ใน Crucible ที่ผ่านการเผาและทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปเผาไหม้โดยใช้ตะเกียงบุนเซ่นจนไม่มีควันดำ จากนั้นจึงนำไปเผาในเตาเผา (Muffle Furnace) ที่อุณหภูมิประมาณ 500 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้เถ้าสีขาว นำไปทำให้เย็นใน Desiccator ชั่งน้ำหนักเถ้าแล้วคำนวณหาปริมาณเถ้าทั้งหมดที่มีในตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้งแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

การคำนวณ ปริมาณเถ้า (g/100g) = $\frac{\text{น้ำหนักเถ้า (g)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$

การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid) **ตามวิธีของ** AOAC (1995)

วิธีวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างน้ำมะม่วงให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนปริมาณ 5 กรัม ใส่ในถ้วยอลูมิเนียมสำหรับวิเคราะห์ค่าความชื้น (Moisture can) ที่ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปอบในตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่จากนั้นนำถ้วยอลูมิเนียมมาทำให้เย็นใน Desiccator ชั่งน้ำหนักแล้วคำนวณหาปริมาณของแข็งทั้งหมดในตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้งแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

การคำนวณ

ปริมาณของแข็งทั้งหมด (g/100g) = $\frac{\text{น้ำหนักของแข็งที่เหลืออยู่ (g)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$

การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Total fat) **โดย** Rose-Gottlieb method **ตามวิธีของ** AOAC (1995)

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างน้ำมะม่วงให้ได้น้ำหนักแน่นอนปริมาณ 10 กรัม ใส่ในกรวยแยก (Separating funnel) เติมสารละลายแอมโมเนีย 1 มิลลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมเอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. เติมไดเอธิลอีเธอร์ 25 มิลลิลิตร ปิดจุกแล้วเขย่าแรงๆ ต่อเนื่องกัน 1 นาที จากนั้นเติมปิโตรเลียมอีเทอร์ 25 มิลลิลิตร ปิดจุกแล้วเขย่าแรงๆอีก 30 วินาที เปิดจุกแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แยกของเหลวชั้นบนซึ่งเป็นชั้นที่ไขมันละลายอยู่ในตัวทำละลายใส่ใน Flask ที่ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว
3. ทำการสกัดไขมันซ้ำอีก 2 ครั้งด้วยไดเอธิลอีเทอร์และปิโตรเลียมอีเทอร์อย่างละ 15 มิลลิลิตร นำชั้นของเหลวที่มีไขมันมารวมกัน นำไปอบให้แห้งในตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง แล้วชั่งหาน้ำหนักของไขมันที่สกัดได้ ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้งแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

$$\textbf{การคำนวณ}\quad \text{ปริมาณไขมัน (g/100g)} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันที่สกัดได้ (g)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$$

การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase activity) **ตามวิธีของ** National canner association research laboratories. (1976)

การเตรียมสารเคมี

- เตรียมสารละลาย Guaiacol ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยชั่ง Guiacol 1.0 กรัม ละลายในเอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
- เตรียมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยนำสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 30 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เจือจางในน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน สารละลายที่ได้เก็บในขวดทึบแสงที่อุณหภูมิไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส นานไม่เกิน 1 สัปดาห์

วิธีวิเคราะห์

ตวงตัวอย่างน้ำมะม่วงปริมาณ 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดใหญ่ เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร สารละลาย Guaiacol 1 มิลลิลิตร และสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 มิลลิลิตร เขย่าหลอดให้เข้ากันแล้วสังเกตปฏิกิริยาหลังจากตั้งทิ้งไว้ 3-5 นาที โดยถ้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงแสดงว่าให้ผลบวก (Positive) กับชุดทดสอบ ถ้าไม่เปลี่ยนสีแสดงว่าให้ผลลบ (Negative) กับชุดทดสอบ

การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนส (Pectinase activity) (AOAC, 1995)

การเตรียมสารเคมี

- สารละลายเพคตินความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ 1.2 ต้มให้เดือดแล้วทิ้งให้เย็น
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์

วิธีวิเคราะห์

1. นำสารละลายเพคตินความเข้มข้นร้อยละ 1 มาครั้งละ 50 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปแช่ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
2. เติมน้ำมะม่วงลงไป 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 7.00 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์
3. นำบีกเกอร์ไปแช่ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที โดยคนสารละลายเป็นครั้งคราว
4. ไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ จนได้ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.00 จดปริมาตรสารละลายไฮดรอกไซด์ที่ใช้

การคำนวณ

$$\text{Enzyme activity (mg methoxyl / ml)} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{M. NaOH} \times 31}{\text{vol. Sample}}$$

เมื่อ ml NaOH คือ ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไตเตรท

M. NaOH คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ไตเตรท

vol. Sample คือ ปริมาตรน้ำมะม่วงที่ใช้ หน่วยเป็น มิลลิลิตร

การวิเคราะห์คุณภาพด้านจุลินทรีย์

การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) ตามวิธีของ AOAC,1995

อุปกรณ์และเครื่องมือ

- จานเพาะเชื้อ (Petri dish)*
- หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตรพร้อมฝาปิด (Test tube)*
- ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร*
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert : Model WB14, Germany)
- ตู้บ่มเชื้อ (Hareaus : Model D-6450 Hanau, Germany)
- หม้อนึ่งความดัน (Hariyama : Model HA-300MIV, Japan)

หมายเหตุ

* จะต้องทำการอบฆ่าเชื้อในตู้อบไอร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 160-180 องศาเซลเซียส เวลา 1.5 ชั่วโมง

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (Bactor® Plate Count Agar, Difco Laboratory, USA)
- Peptone (Bactor® Plate Count Agar, Difco Laboratory, USA)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) ปริมาณ 23.5 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จะมีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0±0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลายสำหรับเจือจาง

ชั่งเปปโตนปริมาณ 25 หรือ 50 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 250 หรือ 500 มิลลิลิตรตามลำดับ จะได้สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ใช้ในการทำเจือจางตัวอย่าง

วิธีวิเคราะห์

1. **การเตรียมตัวอย่าง**
   1.1 ล้างกระป๋องน้ำมะม่วงด้วยผงซักฟอกแล้วล้างน้ำให้สะอาดเช็ดกระป๋องด้านที่เจาะด้วยเอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 75 แล้วลนไฟ เจาะกระป๋องด้านที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนี้
   1.2 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างน้ำมะม่วง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายตัวอย่างที่เจือจาง 1 : 10 หรือ 10^{-1}
   1.3 เขย่าตัวอย่างให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยปั่นผสม Vortex mixer ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างจากข้อ 1.2 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจะได้สารละลายตัวอย่างเจือจาง 1 :100 หรือ 10^{-2}

2. **การเทอาหารเลี้ยงเชื้อ** (Pour plate)
   2.1 ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรดูดสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่างๆ (1^{0}, 10^{-1}, 10^{-2}) ลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร โดยแต่ละระดับความเจือจางจะทำซ้ำ 2 จาน โดยเริ่มจากระดับความเข้มข้นต่ำสุด
   2.2 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่ยังเหลวซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อที่มีสารละลายตัวอย่างปริมาณจานละ 15-20 มิลลิลิตร ภายใน 1-5 นาที
   2.3 ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันดี วางทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว จากนั้นคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อลง

3. **การบ่มเชื้อ**

บ่มจานเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48±3 ชั่วโมง

4. **การตรวจนับโคโลนีและการรายงานผล**

หลังจากบ่มจานเลี้ยงเชื้อครบตามกำหนดเวลาแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี หาค่าจำนวนโคโลนีเฉลี่ยจากทั้งสองจานเพาะเชื้อแล้วรายงานผลว่ามีจำนวน Mesophilic aerobic bacteria ในหน่วย จำนวนโคโลนีต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร (cfu/ml)

การวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และรา (Yeast and Mold) ตามวิธีของ AOAC,1995

อุปกรณ์และเครื่องมือ

- จานเพาะเชื้อ (Petri dish)*
- หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตรพร้อมฝาปิด (Test tube)*
- ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร*
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert : Model WB14, Germany)
- ตู้บ่มเชื้อ (Hareaus : Model D-6450 Hanau, Germany)
- หม้อนึ่งความดัน (Hariyama : Model HA-300MIV, Japan)

หมายเหตุ

* จะต้องทำการอบฆ่าเชื้อในตู้อบไอร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 160-180 องศาเซลเซียส เวลา 45-60 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (Bactor® Potato Dextrose Agar, Difco Laboratory, USA)
- Peptone (Bactor® Plate Count Agar, Difco Laboratory, USA)
- สารละลายกรดทาร์ทาริก ความเข้มข้นร้อยละ 10

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ปริมาณ 39.0 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 3.5 โดยเติมสารละลายกรดทาร์ทาริกความเข้มข้นร้อยละ 10 ลงไป (อาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร ใช้สารละลายกรดทาร์ทาริก 1.9 มิลลิลิตร)

การเตรียมสารละลายสำหรับเจือจาง

ชั่งเปปโตนปริมาณ 25 หรือ50 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 250 หรือ 500 มิลลิลิตรตามลำดับ จะได้สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ใช้ในการทำเจือจางตัวอย่าง

วิธีวิเคราะห์

1. **การเตรียมตัวอย่าง**
   - 1.1 ล้างกระป๋องน้ำมะม่วงด้วยผงซักฟอกแล้วล้างน้ำให้สะอาด เช็ดกระป๋องด้านที่เจาะด้วยเอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 75 แล้วลนไฟ เจาะกระป๋องด้านที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนี้
   - 1.2 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างน้ำมะม่วง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายตัวอย่างที่เจือจาง 1 : 10 หรือ 10^{-1}
   - 1.3 เขย่าตัวอย่างให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยปั่นผสม Vortex mixer ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างจากข้อ 1.2 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจะได้สารละลายตัวอย่างเจือจาง 1 :100 หรือ 10^{-2}

2. **การเทอาหารเลี้ยงเชื้อ** (Pour plate)
   - 2.1 ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรดูดสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่างๆ (1^{0},10^{-1}, 10^{-2}) ลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร โดยแต่ละระดับความเจือจางจะทำซ้ำ 2 จาน โดยเริ่มจากระดับความเข้มข้นต่ำสุด

2.2 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ยังเหลวซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อที่มีสารละลายตัวอย่าง ปริมาณจานละ 15-20 มิลลิลิตร ภายใน 1-5 นาที

2.3 ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันดี วางทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว จากนั้นคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อลง

3. **การบ่มเชื้อ**

บ่มจานเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48±3 ชั่วโมง

4. **การตรวจนับโคโลนีและการรายงานผล**

หลังจากบ่มจานเลี้ยงเชื้อครบตามกำหนดเวลาแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี หาค่าจำนวนโคโลนีเฉลี่ยจากทั้งสองจานเพาะเชื้อแล้วรายงานผลว่ามีจำนวนยีสต์และราทั้งหมดในหน่วยจำนวนโคโลนีต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร (cfu/ml)

การวิเคราะห์ปริมาณโคลิฟอร์มและอี.โคไล (Coliform and *E.coli*) **โดยวิธี** MPN (Most Probable Number Method) **ตามวิธีของ** AOAC, 1995

อุปกรณ์และเครื่องมือ

- หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร (Test tube)พร้อมหลอดดักแก๊ซ (Durham tube) *
- ปิเปตขนาด 1*
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert : Model WB14, Germany)
- ตู้บ่มเชื้อ (Hareaus : Model D-6450 Hanau, Germany)
- หม้อนึ่งความดัน (Hariyama : Model HA-300MIV, Japan)

หมายเหตุ

* จะต้องทำการอบฆ่าเชื้อในตู้อบไอร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 160-180 องศาเซลเซียส เวลา 1.5 ชั่วโมง

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Lactose Bile Broth (Bactor® Brilliant Green Lactose Bile Broth, Difco Laboratory, USA)
- Peptone (Bactor® Plate Count Agar, Difco Laboratory, USA)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Lactose Bile Broth ปริมาณ 40.0 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร นำไปต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จะมีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0$\pm$ 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลายสำหรับเจือจาง

ชั่งเปปโตนปริมาณ 25 หรือ 50 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 250 หรือ 500 มิลลิลิตรตามลำดับ จะได้สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ใช้ในการทำเจือจางตัวอย่าง

วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 ล้างกระป๋องน้ำมะม่วงด้วยผงซักฟอกแล้วล้างน้ำให้สะอาด เช็ดกระป๋องด้านที่เจาะด้วยเอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 75 แล้วลนไฟ เจาะกระป๋องด้านที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนี้

1.2 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างน้ำมะม่วง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายตัวอย่างที่เจือจาง 1 : 10 หรือ 10^{-1}

1.3 เขย่าตัวอย่างให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยปั่นผสม Vortex mixer ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างจากข้อ 1.2 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจะได้สารละลายตัวอย่างเจือจาง 1 : 100 หรือ 10^{-2}

2. **การวิเคราะห์แบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโคลิฟอร์ม** (Presumptive coliforms)

2.1 ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิตรดูดสารละลายตัวอย่างที่ระดับเจือจางต่างๆ ($1,10^{-1},10^{-2}$) ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Lactose Bile Broth ปริมาณ 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 ชุด ชุดละ 5 หลอดดังนี้

ชุดที่ 1 ปิเปตตัวอย่างน้ำผลไม้จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 5 หลอด

ชุดที่ 2 ปิเปตสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 5 หลอด

ชุดที่ 2 ปิเปตสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้ที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 5 หลอด

2.2 บ่มหลอดเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48±3 ชั่วโมง หากหลอดทดลองใดมีแก๊ซเกิดขึ้นในหลอดเดอแฮมหรือให้ผลบวก (Positive) ซึ่งคาดว่าจะมีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดโคลิฟอร์มเจริญอยู่ในตัวอย่างน้ำผลไม้นั้น ถ้าไม่พบว่ามีแก๊ซเกิดขึ้นในหลอดทดลองใดเลย แสดงว่าให้ผลลบ (Negative) และไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดโคลิฟอร์มเจริญอยู่ในตัวอย่างน้ำผลไม้นั้น

2.3 การรายงานจำนวนโคลิฟอร์มในตัวอย่างที่เกิดแก๊ซ ให้เปิดตารางแมคครา ดีแล้วรายงานผลเป็นจำนวนโคลิฟอร์มแบคทีเรียต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร (cfu/ml)

3. **การยืนยันโคลิฟอร์ม**

3.1 ใช้ห่วง (Loop) เขี่ยเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลบวกจากการทดสอบแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโคลิฟอร์ม ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue Agar ในจานเลี้ยงเชื้อ

3.2 บ่มจานเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.3 ตรวจหาโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของโคลิฟอร์ม โดยโคโลนีของโคลิฟอร์มจะมีสีดำหรือสีดำตรงกลางล้อมรอบด้วยบริเวณโปร่งใสไม่มีสี โคลิฟอร์มบางโคโลนีมีลักษณะนูนเปียกเยิ้ม (Mucoid)

3.4 บันทึกจำนวนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชุดที่มีเชื้อจุลินทรีย์โคลิฟอร์มที่ได้รับการยืนยันแล้ว

4. **การวิเคราะห์แบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E.coli***

4.1 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle) เขี่ยเชื้อจากหลอดทดลองที่ให้ผลบวกจากการทดสอบแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโคลิฟอร์ม ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Lactose Bile Broth จำนวน 10 มิลลิลิตร หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ต้องปรับอุณหภูมิเท่ากับ 44.5 องศาเซลเซียสก่อนนำไปใช้

4.2 เขี่ยเชื้อ *E.coli* ซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Lactose Bile Broth จำนวน 10 มิลลิลิตร อีก 2 หลอด สำหรับเป็นหลอดเปรียบเทียบ (Control)

4.3 บ่มหลอดเลี้ยงเชื้อในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 44.5±0.5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.4 หลอดทดลองที่มีก๊าซเกิดขึ้นหรือให้ผลบวก (Positive) แสดงว่ามีแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็น *E.coli* ให้ทำการวิเคราะห์เพื่อยืนยัน *E.coli*

5. **การวิเคราะห์เพื่อยืนยัน *E.coli***

5.1 เขี่ยเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลบวกจากการทดสอบแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E.coli* ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue Agar ในจานเลี้ยงเชื้อ

5.2 บ่มจานเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

5.3 เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *E.coli* ซึ่งมีสีน้ำเงินอมดำตรงกลาง และมีสีเลื่อมมันอมเขียวสะท้อนแสงซึ่งบางครั้งสีเลื่อมมันอาจไม่ปรากฏ เขี่ยเชื้อครั้งละ 1 โคโลนีลงในน้ำทริบโตน (Tryptone water) และบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 44.5+0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.4 เขี่ยเชื้อ *E.coli* มาตรฐานในหลอดน้ำทริปโตนเพื่อเป็นตัวอย่างควบคุม

5.5 ทดสอบสารอินโดล หลอดที่มีอินโดลเกิดขึ้นแสดงว่าเป็นเชื้อ *E.coli* จากนั้นบันทึกจำนวนหลอดทดลองที่ให้ผลบวก

5.6 คำนวณและรายงานค่า MPN ของ Coliform และ *E.coli* ในตัวอย่างน้ำผลไม้ 1 มิลลิลิตร

5.7 การทดสอบยืนยันเพิ่มเติมเกี่ยวกับ Coliform และ *E.coli* ควรทำการทดสอบเมธิลเรด (Methyl red) โวเกส-พรอสเกาเออร์ (Voges-Proskauer) และซิเตรต (Citrate test) โดยก่อนจะทดสอบปฏิกิริยาเหล่านี้ต้องแยกเชื้อ *E.coli* ให้บริสุทธิ์ก่อน

ตาราง ค-5 : ตารางแมคคราดี

แสดงความน่าจะเป็นของปริมาณแบคทีเรียที่ได้จากการประเมินโดยวิธีหลอดเจือจาง (Dilution tube method) หรือค่าเอ็มพีเอ็น (Most probable number) ในอาหาร 1 กรัมหรือ 1 มิลลิลิตร เทียบจากหลอดที่ให้ปฏิกิริยาบวก โดย 5 หลอดมีตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 10^{-1} จำนวน 10 มิลลิลิตร อีก 5 หลอดมีตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 10^{-2} และอีก 5หลอดมีตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 10^{-3} จำนวน 1 มิลลิลิตร

จำนวนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อและจำนวนตัวอย่างที่เจือจางระดับต่างๆที่เติมในแต่ละหลอด			MPN ของแบคทีเรียต่อกรัมตัวอย่าง	จำนวนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อและจำนวนตัวอย่างที่เจือจางระดับต่างๆที่เติมในแต่ละหลอด			MPN ของแบคทีเรียต่อกรัมตัวอย่าง
5 หลอดที่ 10^{-1} จำนวน 1 มล.	5 หลอดที่ 10^{-1} จำนวน 1 มล.	5 หลอดที่ 10^{-1} จำนวน 1 มล.		5 หลอดที่ 10^{-1} จำนวน 1 มล.	5 หลอดที่ 10^{-1} จำนวน 1 มล.	5 หลอดที่ 10^{-1} จำนวน 1 มล.	
0	0	0	0	3	0	1	11
0	0	1	2	3	0	2	13
0	0	2	4	3	1	0	11
0	1	0	2	3	1	1	14
0	1	1	4	3	1	2	17
0	1	2	6	3	3	3	20
0	2	0	4	3	2	0	14
0	2	1	6	3	2	1	17
0	3	0	6	3	2	2	20
1	0	0	6	3	3	0	17
1	0	1	4	3	3	1	21
1	0	2	6	3	4	2	21
1	0	3	8	3	4	1	24
1	1	0	4	3	5	0	25
1	1	1	6	4	0	0	13
1	1	2	6	4	0	1	17
1	2	0	6	4	0	2	21
1	2	1	8	4	0	3	25
1	2	2	10	4	1	0	17
1	3	0	8	4	0	1	21
1	3	1	10	4	1	2	26
1	4	0	11	4	2	0	22
2	0	0	5	4	2	1	26
2	0	1	7	4	2	2	32

ตาราง ค-5 : ตารางแมคคราดี (ต่อ)

จำนวนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อและจำนวนตัวอย่างที่เจือจางระดับต่างๆที่เติมในแต่ละหลอด			MPN ของแบคทีเรียต่อกรัมตัวอย่าง	จำนวนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อและจำนวนตัวอย่างที่เจือจางระดับต่างๆที่เติมในแต่ละหลอด			MPN ของแบคทีเรียต่อกรัมตัวอย่าง
5 หลอดที่ 10^{-1} จำนวน 1 มล.	5 หลอดที่ 10^{-1} จำนวน 1 มล.	5 หลอดที่ 10^{-1} จำนวน 1 มล.		5 หลอดที่ 10^{-1} จำนวน 1 มล.	5 หลอดที่ 10^{-1} จำนวน 1 มล.	5 หลอดที่ 10^{-1} จำนวน 1 มล.	
2	0	2	9	4	3	0	27
2	0	3	12	4	3	1	33
2	1	0	7	4	3	2	39
2	1	1	9	4	4	0	34
2	1	2	12	4	4	1	40
2	2	0	9	4	5	0	41
2	2	1	12	4	5	1	48
2	2	2	14	5	0	0	23
2	3	0	12	5	0	1	31
2	3	1	14	5	3	2	43
2	4	0	15	5	4	3	58
2	0	0	8	5	4	4	76
5	1	0	33	5	4	5	253
5	1	1	46	5	4	0	130
5	1	2	63	5	4	1	172
5	1	3	64	5	4	2	221
5	2	0	49	5	5	3	278
5	2	1	70	5	5	4	345
5	2	2	94	5	5	5	246
5	2	3	120	5	5	0	240
5	2	4	148	5	5	1	348
5	2	5	177	5	5	2	542
5	3	0	79	5	5	3	920
5	3	1	109	5	5	4	1600
5	3	2	141	5	5	5	>1600
5	3	3	175				
5	3	4	212				

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ภาคผนวก ง.

ตัวอย่างการคำนวณ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตัวอย่างการคำนวณเพื่อกำหนดระดับปัจจัยทดลอง

ในการทดลองแบบ Factorial experiment in CCD ซึ่งแต่ละปัจจัยทดลองมี 5 ระดับ ได้แก่ ระดับต่ำ (-1) ระดับสูง (+1) จุดกึ่งกลาง (0) และตำแหน่ง $\pm\alpha$ ในเบื้องต้นจะทำการกำหนดช่วงค่าต่ำสุดและสูงสุดของปัจจัยทดลองนั้นก่อน แล้วจึงทำการคำนวณเพื่อหาระดับอื่นๆ ดังนี้

ตัวอย่าง ปัจจัยทดลอง A มีช่วงค่าที่ทดลองอยู่ระหว่างร้อยละ 30 - 40 แสดงว่าในการทดลองนี้กำหนดให้ใช้น้ำมะม่วงที่ระดับต่ำสุด ($-\alpha$) คือร้อยละ 30 และระดับสูงสุด ($+\alpha$) คือร้อยละ 40 ดังนั้นจึงมีจุดกึ่งกลาง (0) คือร้อยละ 35 สามารถนำมาใช้คำนวณหาระดับต่ำ(-1) และระดับสูง (+1) ได้ดังนี้

ค่า α หมายถึงระยะทางจากจุดกึ่งกลาง (0) ถึงจุดสูง/ต่ำสุด ($\pm\alpha$) คำนวณ ได้จาก

$$\alpha = 2^{(k-P)/4}$$

เมื่อ k คือจำนวนของปัจจัยทดลอง ในที่นี้สมมติเท่ากับ 3

P คือ Fractionalization elements ในที่นี้เท่ากับ 0 เนื่องจากไม่มี fractionalization ของการทดลอง

เมื่อแทนค่าตัวแปรในสมการจะได้ว่าการทดลองนี้ มีค่า α เท่ากับ 1.682 จากนั้นทำการคำนวณปริมาณปัจจัยที่ระดับต่ำ(-1) และระดับสูง(+1) ของน้ำมะม่วง โดยอาศัยความสัมพันธ์ดังนี้

$$\frac{\text{ระยะห่างจากจุดกึ่งกลาง(0)ถึงจุดสูง/ต่ำสุด}(\pm\alpha)}{1.682} = \frac{\text{ระยะห่างจากจุดกึ่งกลาง(0)ถึงจุด}(\pm1)}{1}$$

จะได้ $\frac{5}{1.682}$ = ระยะห่างจากจุดกึ่งกลาง(0) ถึงจุด (±1) = $2.973 \approx 3$

นำค่านี้ไปลบและบวกจากระดับที่จุดกึ่งกลางจะได้ระดับน้ำมะม่วงที่ระดับต่ำ(-1) และระดับสูง(+1) จะได้ค่าเท่ากับร้อยละ 32 และร้อยละ 38 ตามลำดับ

ตัวอย่างการคำนวณเพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของปัจจัยทดลองในแผนการทดลอง Mixture design

ตัวอย่าง หาอัตราส่วนของน้ำสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ มินต์ ชะเอม และคาโมมายล์ ที่เหมาะสมต่อคุณภาพด้านสีปรากฏ

1. การหาสมการความสัมพันธ์ระหว่างคะแนนความชอบด้านสีปรากฏกับปัจจัยทดลอง ทำโดยนำค่า Mean ideal ratio score ของความชอบด้านสีปรากฏที่ได้จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสมาวิเคราะห์ Linear regression กับปัจจัยทดลองทีละ 2 ปัจจัย โดยใช้ความสัมพันธ์แบบ polynomial จะได้สมการทั้งหมด 3 สมการ เท่ากับจำนวนของ Interaction ดังนี้

เมื่อกำหนด M หมายถึง น้ำมินต์ (ร้อยละ)
L หมายถึง น้ำชะเอม (ร้อยละ)
C หมายถึง น้ำคาโมมายล์ (ร้อยละ)

สมการความสัมพันธ์ของลักษณะด้านสีปรากฏ

สีปรากฏ = 6.32277(L)+ 2.85882(M)- 15.6784(LxM) R^2=0.9924 ----------(1)
สีปรากฏ = 5.55417(L)+ 2.40624(C)- 11.9684(LxC) R^2=0.9942 ----------(2)
สีปรากฏ = 3.25022(M)+3.06955(C)- 8.68608 (MxC) R^2=0.9932 ----------(3)

2. นำสมการความสัมพันธ์ทั้ง 3 สมการ แทนค่าสีปรากฏด้วยค่าในอุดมคติคือ 1.00 ซึ่งเป็นจุดที่ดีที่สุด จากนั้นจึงทำ Partial derivatives โดยเทียบกับตัวแปรที่ปรากฏอยู่ในสมการ ดังนั้นแต่ละสมการจึงสามารถทำ Partial derivatives ได้ 2 ครั้ง ดังนี้

สมการที่ (1) สีปรากฏ = 6.32277(L)+ 2.85882(M)- 15.6784(LxM)
ทำ Partial derivatives ได้สมการ

$\frac{\delta_1}{\delta_L}$ = 0 = 6.32277-15.6784(M) ----------(1.1)

$\frac{\delta_1}{\delta_M}$ = 0 = 2.85882-15.6784(L) ----------(1.2)

สมการที่ 2 และ 3 นำมาทำ Partial derivatives เช่นเดียวกัน ได้สมการดังนี้

5.55417-11.9684(C) = 0 ----------(2.1)

2.40624-11.9684 (L) = 0 ----------(2.2)

3.25022-8.6808(C) = 0 ----------(3.1)

3.06955-8.6808(M) = 0 ----------(3.2)

3. สมการทั้ง 6 สมการนำมาลบด้วยค่า Lag range (λ) ดังนี้

15.6748(M) - λ = 6.32277---------(1.1)

15.6748(L) - λ = 2.85882---------(1.2)

11.9684(C) - λ = 5.55417---------(2.1)

11.9684(L) - λ = 2.40624---------(2.2)

8.68608(C) - λ = 3.25022---------(3.1)

8.68608(M) - λ = 3.06955---------(3.2)

4. นำสมการทั้งหมดไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมเชิงเส้น (Linear programming) เพื่อหาอัตราส่วนของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดที่เหมาะสมต่อลักษณะด้านสีปรากฏ โดยจำเป็นต้องกำหนดสมการข้อจำกัด (Constraints) ของการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

$30 \leq M \leq 50$

$10 \leq L \leq 30$

$30 \leq C \leq 60$

$M + L + C = 100$

ผลการวิเคราะห์พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับลักษณะด้านสีปรากฏประกอบด้วย น้ำมินต์ ร้อยละ 41 น้ำชะเอม ร้อยละ 21 และ น้ำคาโมมายล์ ร้อยละ 38

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวรุ่งอรุณ หอมดอก	
วัน เดือน ปีเกิด	11 เมษายน 2517	
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2533	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนพิริยาลัยจังหวัดแพร่
	พ.ศ. 2538	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ทุนการศึกษา	ได้รับทุนโครงการพัฒนาอาจารย์จากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	
ประสบการณ์	พ.ศ. 2539-2540	เจ้าหน้าที่ฝ่ายควบคุมคุณภาพ บริษัทบี บี ดีเวลลอปเมนท์ จำกัด จ. เชียงราย
	พ.ศ. 2540-2542	เจ้าหน้าที่ฝ่ายประกันคุณภาพ บริษัทเซเรบอส (ประเทศไทย) จำกัด จ. ชลบุรี

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University