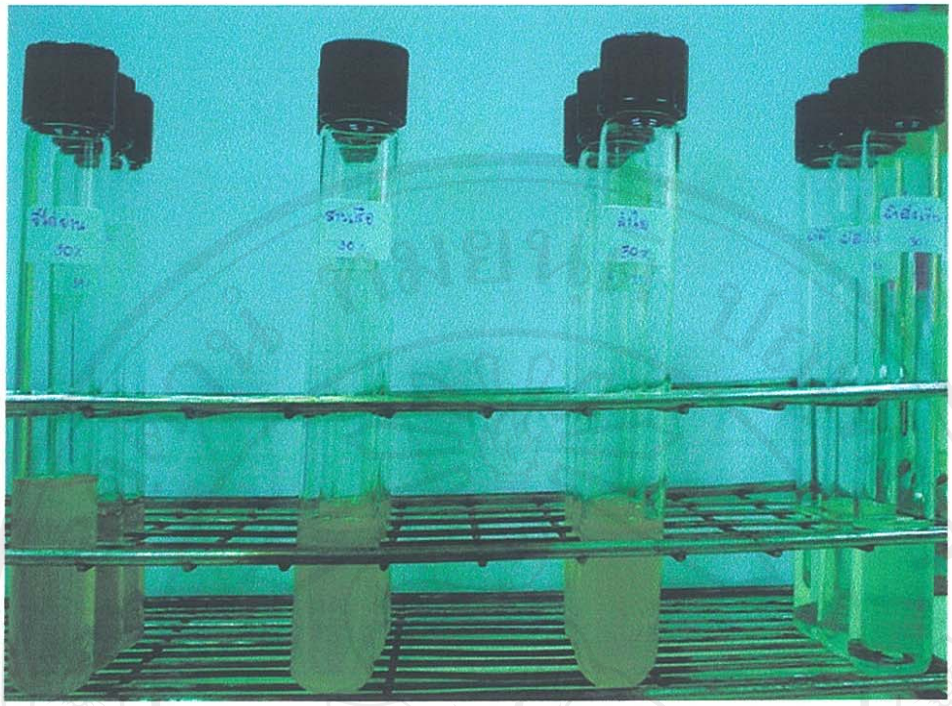
ภาคผนวก ก

ภาพน้ำผึ้ง เชื้อจุลินทรีย์ และ ภาพแสดงวิธีการทดสอบความไวต่อยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี disc diffusion method

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ ก-1 น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลำไย น้ำผึ้งขี้ไก่ย่าน และน้ำผึ้งเทียม (จากขวาไปซ้าย)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ ก-2 สารละลายน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์

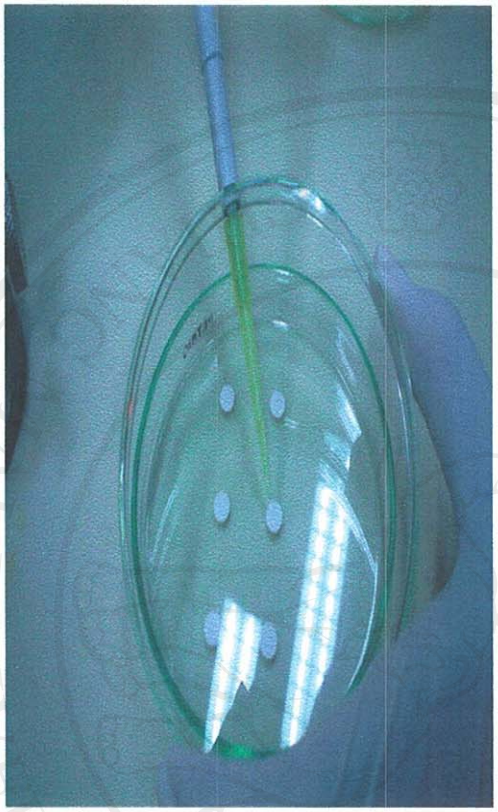
ภาพที่ ก-3 การใช้ test-strip วัดปริมาณสารไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

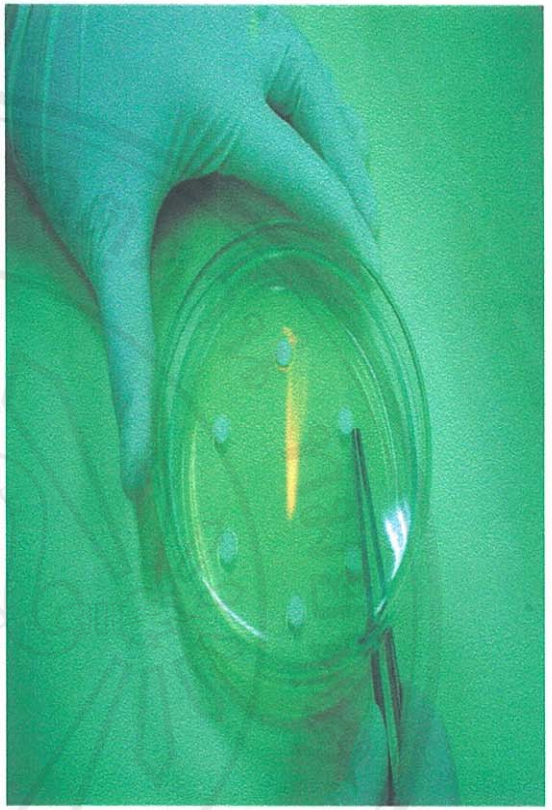
ภาพที่ ก-4 การวัดปริมาณสารไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(1)



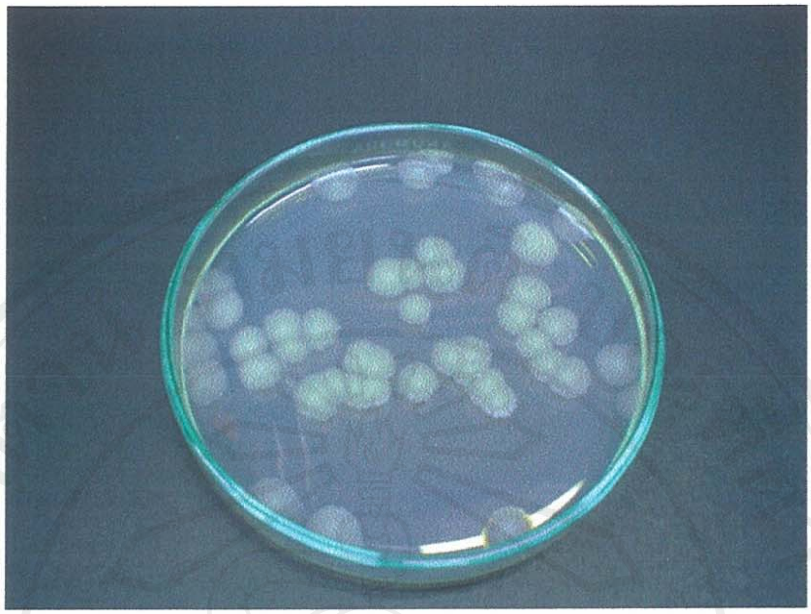
(2)



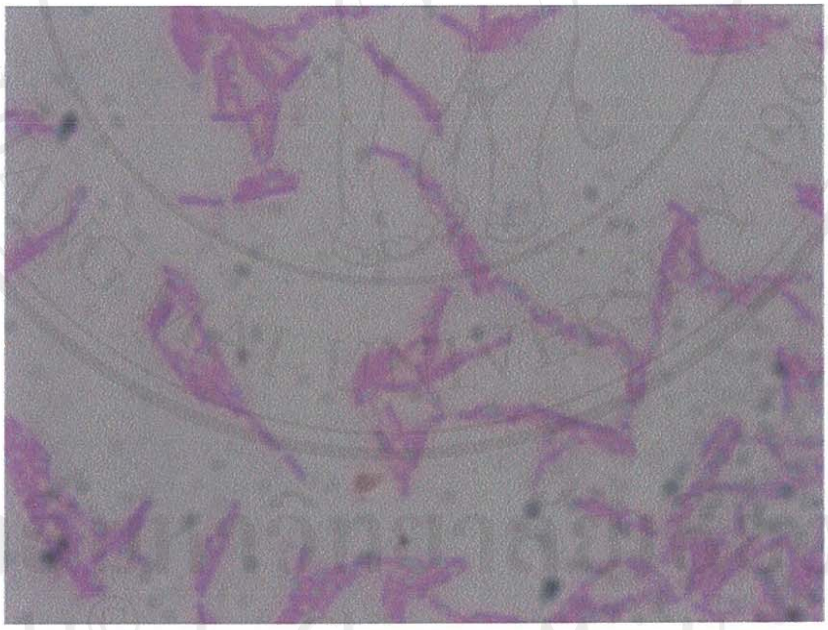
(3)

ภาพที่ ก-5 การทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้น้ำผึ้ง ด้วยวิธี disc diffusion

(1) ใช้ไมครปิเปตดูดสารละลายน้ำผึ้ง (2) หยดลงบนแผ่นกระดาษ disc ที่ใช้ในการทดสอบ (3) แล้วนำไปวางบนผิวหน้าอาหารแข็งที่ถ่ายเชื้อไว้แล้ว

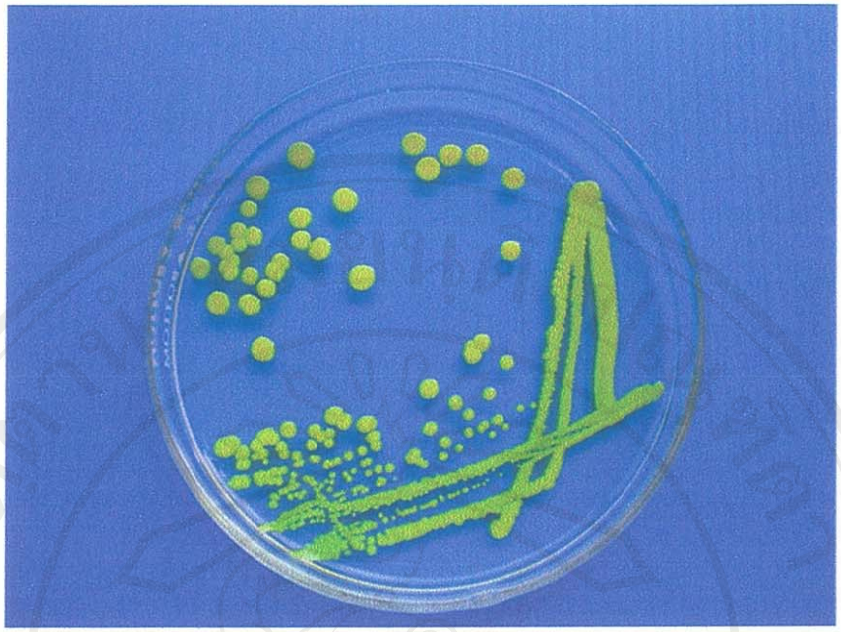


ภาพที่ ก-6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus cereus*

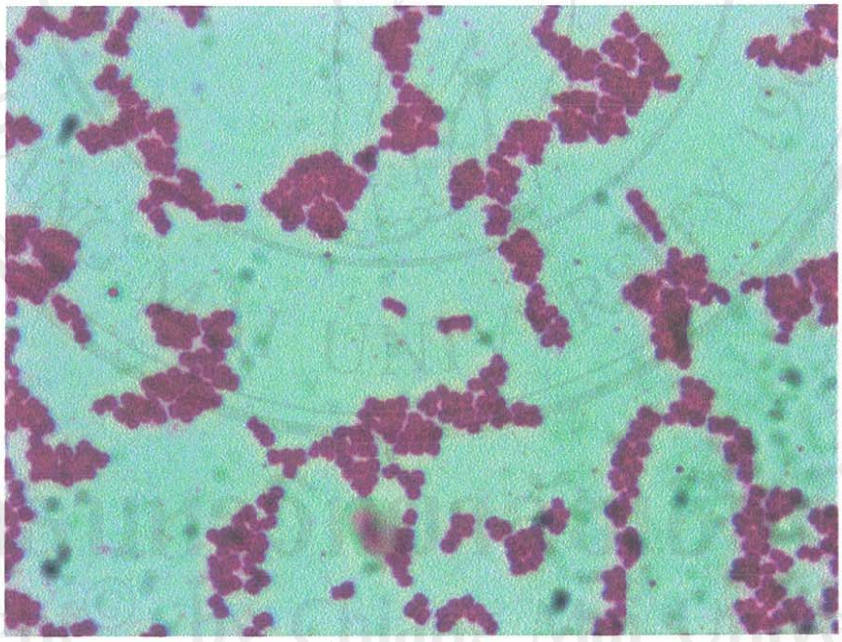


ภาพที่ ก-7 ลักษณะเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus cereus*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



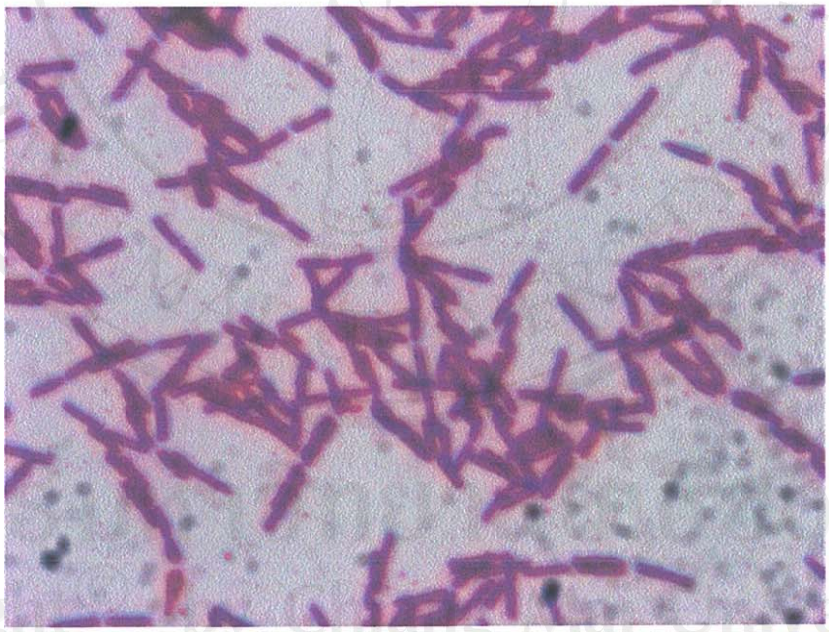
ภาพที่ ก-8 ลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ *Micrococcus luteus*



ภาพที่ ก-9 ลักษณะเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ *Micrococcus luteus*

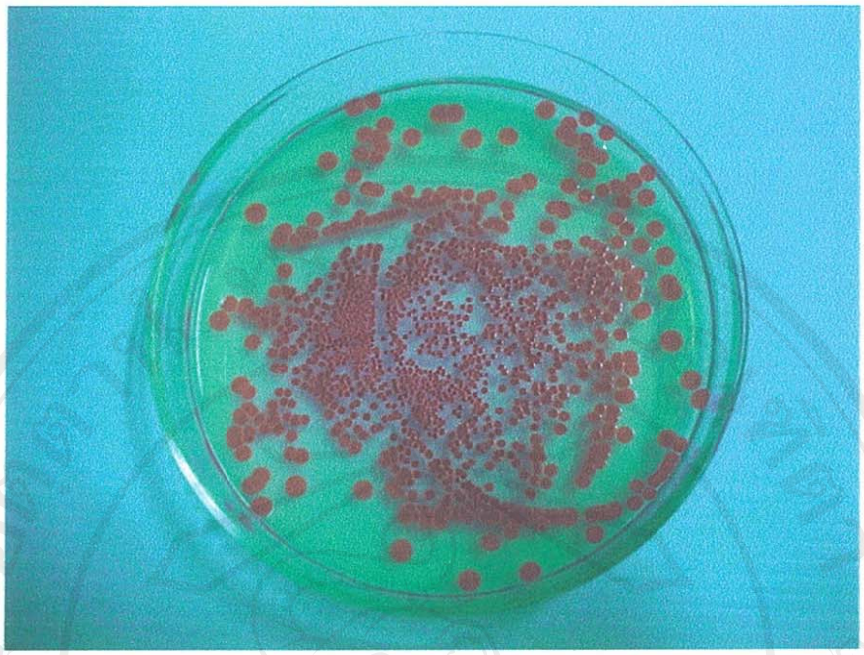
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ ก-10 ลักษณะเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ *Pseudomonas fluorescens*

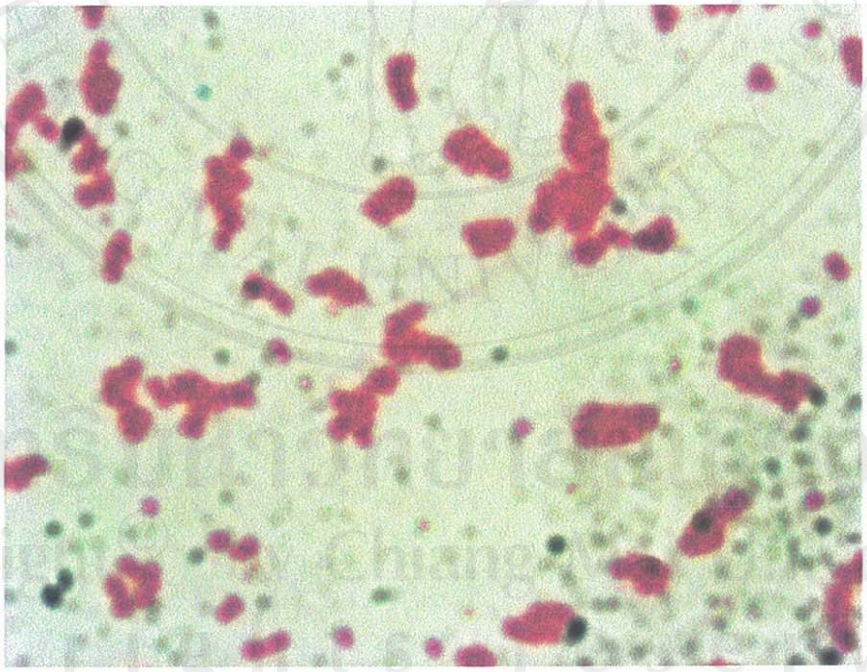


ภาพที่ ก-11 ลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ *Pseudomonas fluorescens*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

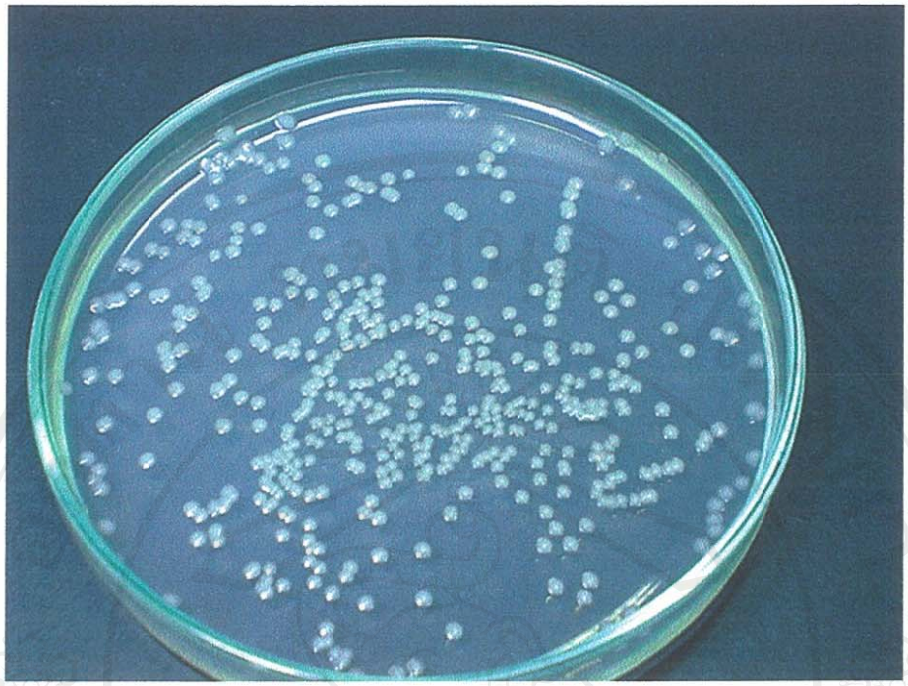


ภาพที่ ก-12 ลักษณะเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ *Serratia marcescens*

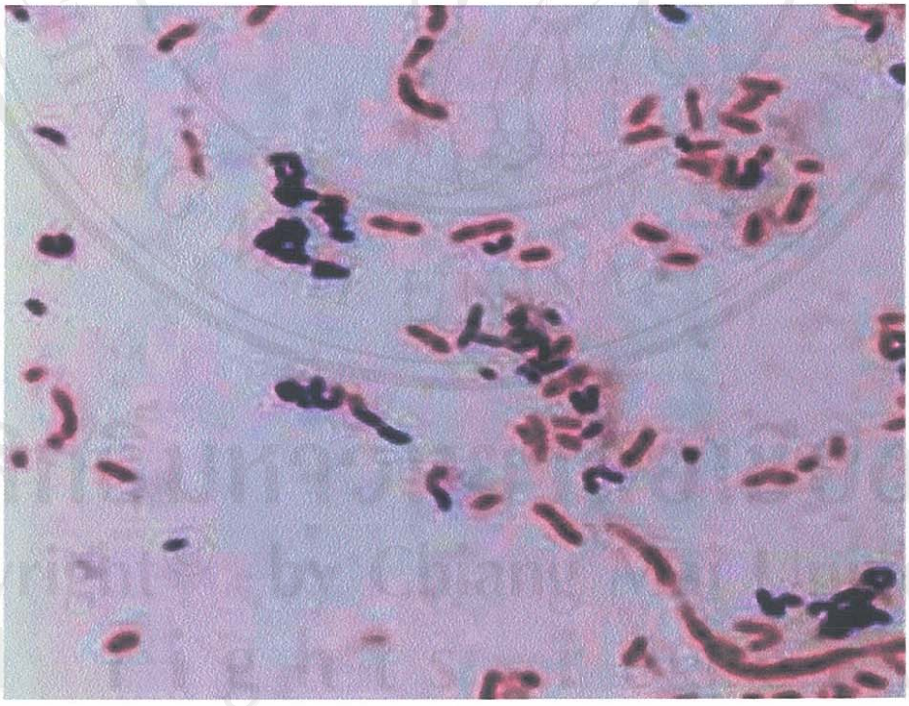


ภาพที่ ก-13 ลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ *Serratia marcescens*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

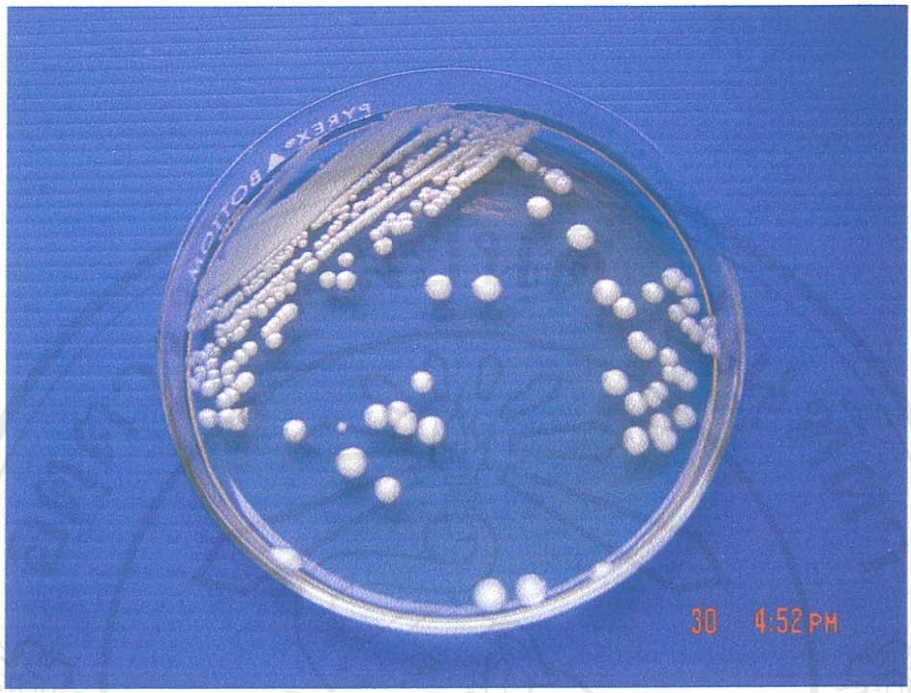


ภาพที่ ก-14 ลักษณะเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter aerogenes*

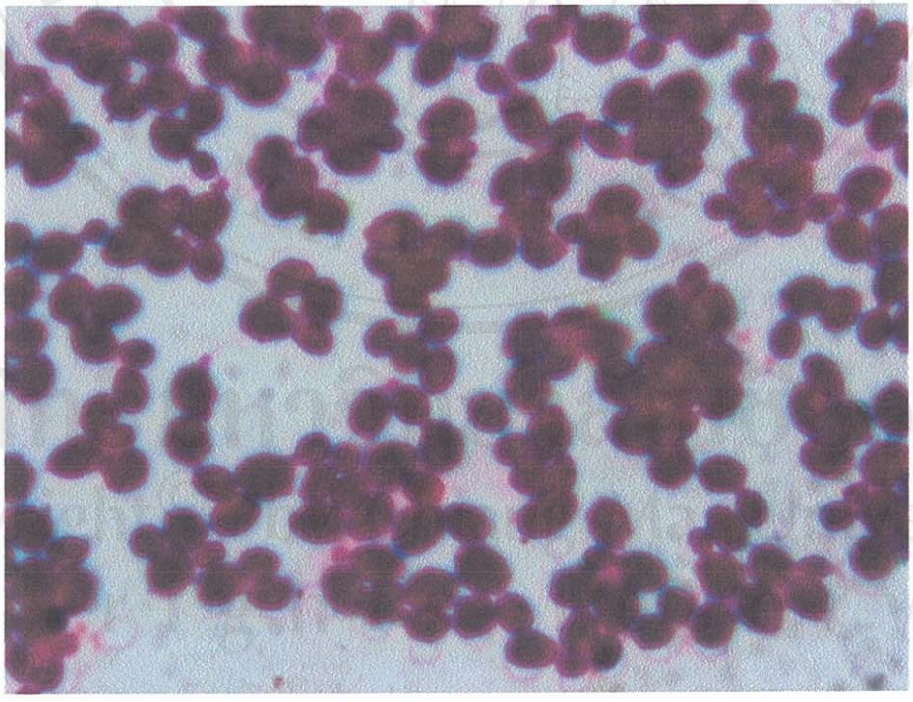


ภาพที่ ก-15 ลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter aerogenes*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

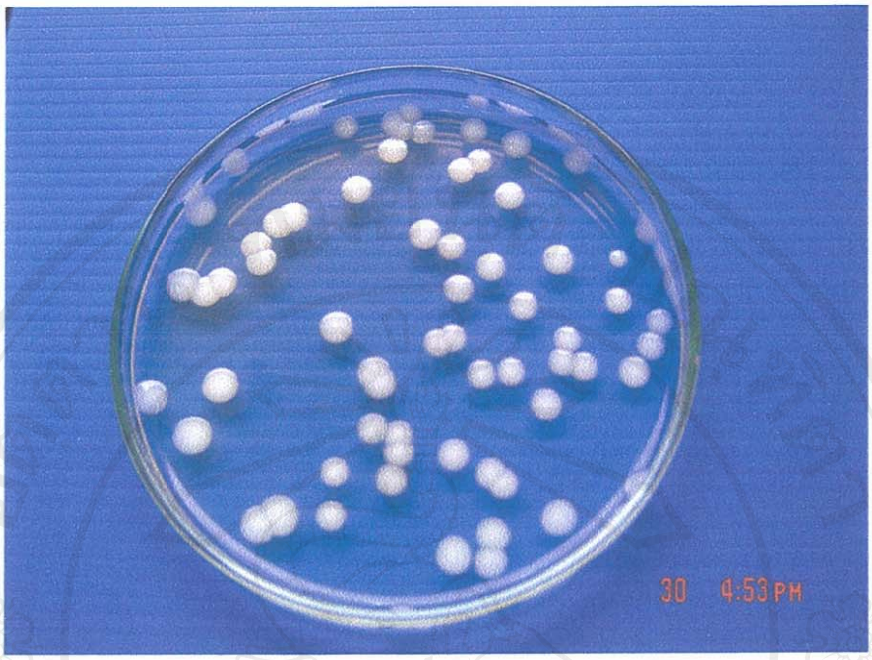


ภาพที่ ก-16 ลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ *Saccharomyces cerevisiae*

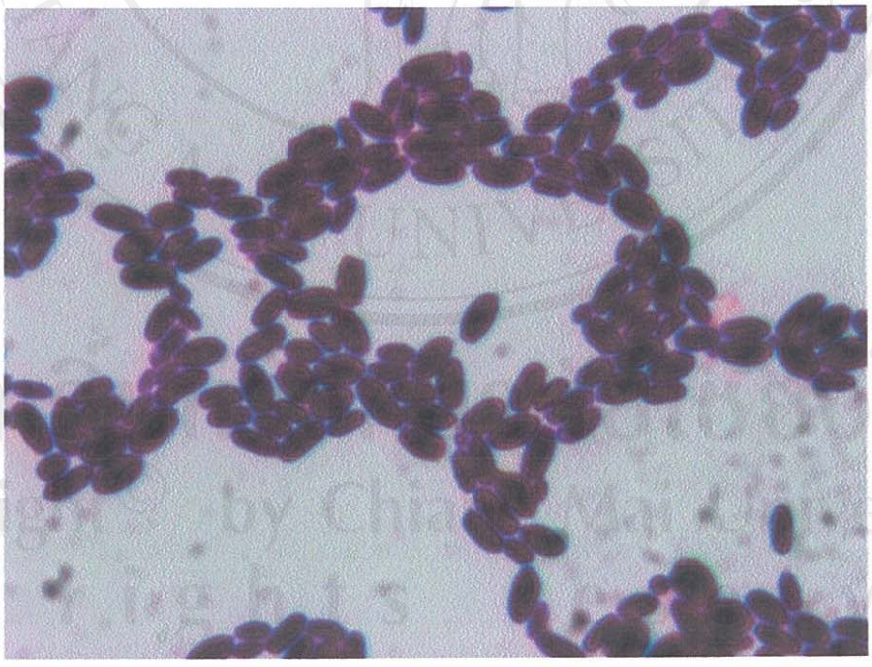


ภาพที่ ก-17 ลักษณะเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ *Saccharomyces cerevisiae*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ ก-18 ลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ *Candida utilis*

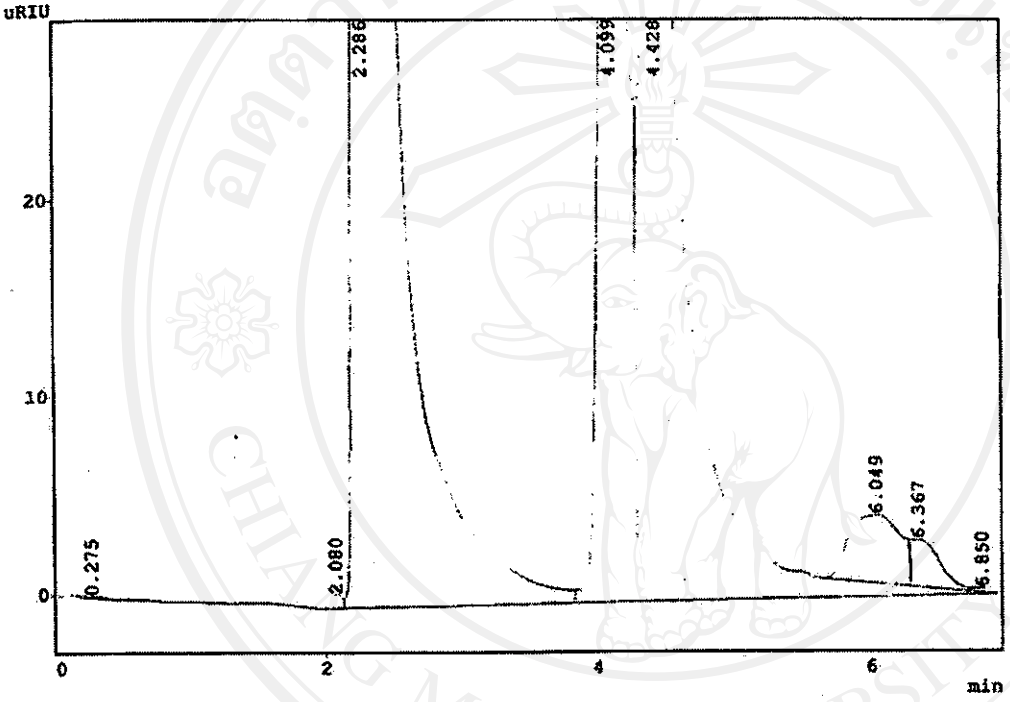


ภาพที่ ก-19 ลักษณะเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ *Candida utilis*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

```
ample          : SAB
D              : 004
ample Amount   : 1
ype            : Unknown
etector        : RID-10A
perator        : kanokwan
ethod Name     : SUGAR.MET
```

** Chromatogram *** Filename:004.C01



*** Peak Report ***

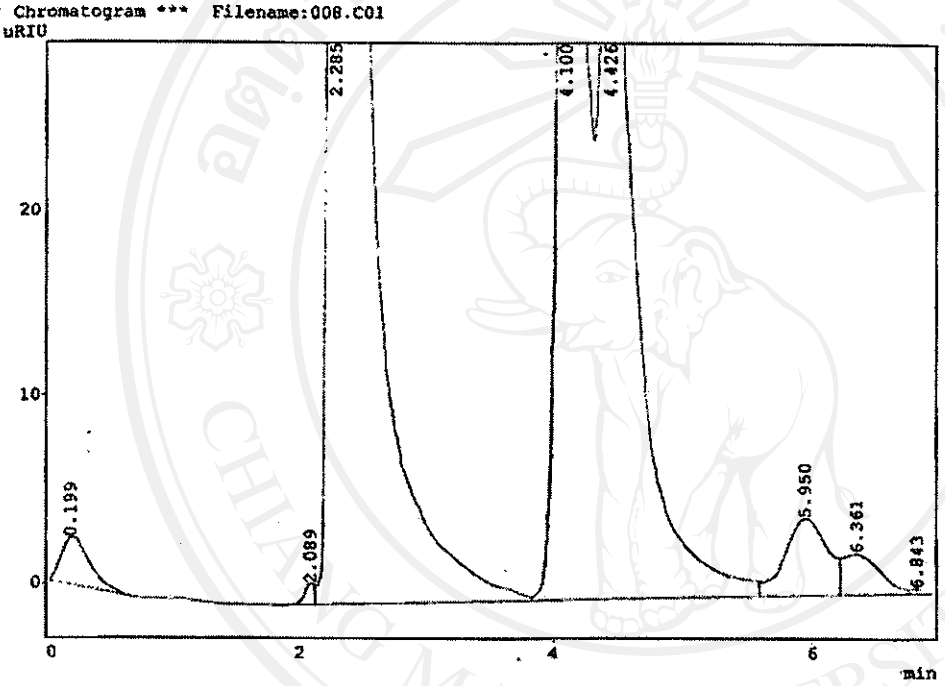
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	0.275	1137	118	V			
2	2.080	3682	714				
3	2.286	2455906	165578	V			
4	4.099	767157	62944	V	1	42.4943	Fructose
5	4.428	1089587	55422	SV	2	39.6448	Glucose
6	6.049	91763	3484	T			
7	6.367	38260	2417	TV			
8	6.850	1834	203	TV			
		4449325	290878			82.1390	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ ก-20 กราฟแสดงการวิเคราะห์น้ำตาลในน้ำผึ้งสาบเสือ

ample : K
D : 008
ample Amount : 1
ype : Unknown
etector : RID-10A
perator : kanokwan
ethod Name : SUGAR.MET

** Chromatogram *** Filename:008.C01



** Peak Report ***

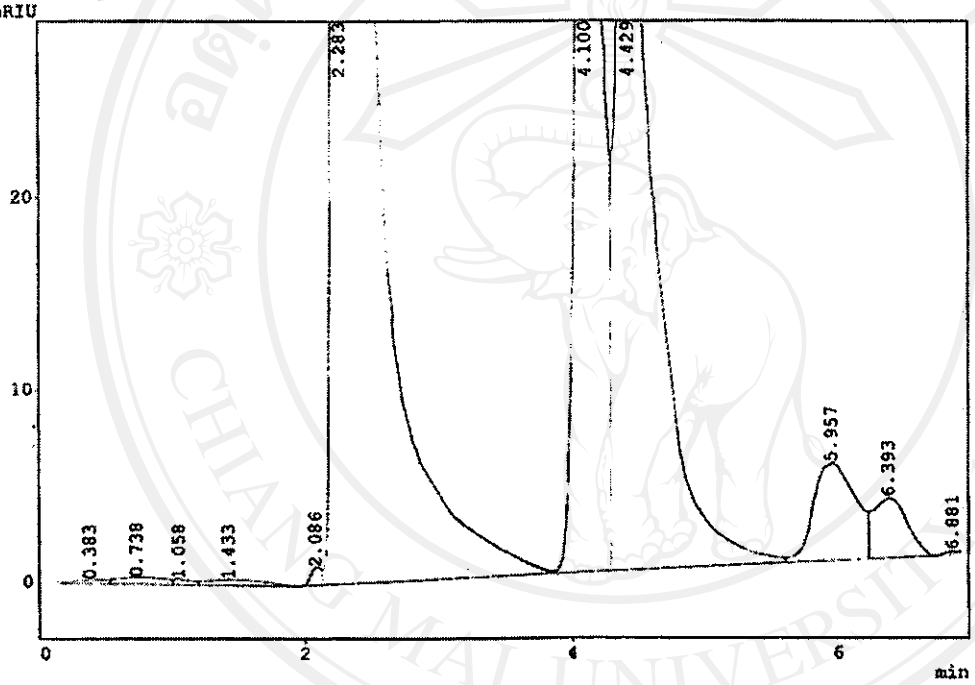
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	0.199	41104	2526				
2	2.089	6314	1118				
3	2.285	2438270	165163	V			
4	4.100	856755	71576	V	1	47.4573	Fructose
5	4.426	817399	44194	V	2	29.7412	Glucose
6	5.950	97347	4176	V			
7	6.361	45056	2226	V			
8	6.843	2258	258	V			
		4304502	291236			77.1985	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ ก-21 กราฟแสดงการวิเคราะห์น้ำตาลในน้ำผึ้งชี้ไก่ย่าน

Sample : LON
ID : 011
Sample Amount : 1
Type : Unknown
Detector : RID-10A
Operator : kanokwan
Method Name : SUGAR.MET

*** Chromatogram *** Filename:011.C01



*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	0.383	3575	196	V			
2	0.738	8991	355	V			
3	1.058	2707	291	V			
4	1.433	8494	292	V			
5	2.086	5177	953				
6	2.283	2498483	169915	V			
7	4.100	716467	61181	V	1	39.6864	Fructose
8	4.429	882771	50704	V	2	32.1197	Glucose
9	5.957	113159	5090	V			
10	6.393	57981	3163	V			
11	6.881	1928	241	V			
		4299731	292380			71.8062	

ภาพที่ ก-22 กราฟแสดงการวิเคราะห์น้ำตาลในน้ำผึ้งลำไย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์คุณภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

ภาคผนวก ข-1

การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000)

ปริมาณเถ้า หมายถึง ปริมาณสารที่เหลือหลังจากการเผาที่อุณหภูมิ 525-550 องศาเซลเซียส

หลักการ

เป็นการหาปริมาณสารที่เหลือจากการเผาตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 525-550 องศาเซลเซียส ในเตาเผา ไฟฟ้า

อุปกรณ์

1. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ
2. ตะเกียงบุนเซน
3. เดซิกเคเตอร์ที่มีสารดูดความชื้น เช่นซิลิกาเจล (silica gel)

เครื่องมือ

1. เตาเผาไฟฟ้าที่ปรับและควบคุมอุณหภูมิได้
2. เตาเผาไฟฟ้า
3. ตู้ดูดควัน
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า ชั่งน้ำหนักได้ละเอียด 0.1 มิลลิกรัม

วิธีวิเคราะห์

1. เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 525 ถึง 550 องศาเซลเซียส (เท่ากับอุณหภูมิที่ใช้เผาตัวอย่าง) นาน 30 นาที ทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ ชั่งน้ำหนัก (W1) และใส่ตัวอย่างทันทีในถ้วยกระเบื้องเคลือบ ชั่งให้ได้น้ำหนักแน่นอน 2-3 กรัม (W2)
2. นำไปเผาด้วยไฟอ่อนบนเตาไฟฟ้า โดยเพิ่มความร้อนขึ้นทีละน้อย จนตัวอย่างไหม้เกรียม และเผาต่อด้วยตะเกียงบุนเซนจนหมดควัน
3. นำไปเผาต่อในเตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 525 ถึง 550 องศาเซลเซียสจนได้เถ้าสีขาว
4. ทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักไว้
5. ถ้าเถ้าที่ได้ไม่ขาว ให้หยดน้ำเล็กน้อยพอเปียกชุ่ม (ระวังอย่าให้เถ้าฟุ้งหรือกระเด็น) นำไประเหยแห้งบนเครื่องอังน้ำ และทำซ้ำตามข้อ 2-4 โดยใช้เวลาในเผาบนเตา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไฟฟ้าเพียง 1 ชั่งโมง จนได้น้ำหนักคงที่ (น้ำหนักคงที่ หมายถึง ผลต่างของการชั่งสองครั้งติดกันมีค่าไม่เกิน 2 มิลลิกรัม) ชั่งน้ำหนักที่ได้ (W3)

การบันทึก

บันทึกข้อมูลและผลการคำนวณในตาราง : แบบบันทึกผลการวิเคราะห์เถ้า

วิธีคำนวณ

ปริมาณเถ้าทั้งหมด ร้อยละของน้ำหนัก $= \frac{(W3 - W1) \times 100}{W2 - W1}$

เมื่อ

W1 คือ น้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบ เป็นกรัม

W2 คือ น้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบและตัวอย่าง เป็นกรัม

W3 คือ น้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบและเถ้า เป็นกรัม

แบบบันทึกผลการวิเคราะห์เถ้าของตัวอย่าง น้ำผึ้ง .....

วัน ที่ทำการวิเคราะห์ วันที่..... เดือน..... พ.ศ. .....

น้ำหนักเป็นกรัม	ครั้งที่ 1	ครั้ง 2	ครั้งที่ 3
No. Crucible			
น้ำหนัก Crucible (W1)			
น้ำหนัก Crucible +น้ำหนักตัวอย่าง (W2)			
น้ำหนักตัวอย่าง (W2 – W1)			
น้ำหนัก Crucible + น้ำหนักเถ้าหลังเผา 1) 2) 3)			
น้ำหนัก Crucible + น้ำหนักเถ้าหลังเผา ที่คงที่ (W3)			
น้ำหนักเถ้าที่เหลือ (W3 – W1)			
ปริมาณเถ้า คิดเป็นร้อยละของน้ำหนัก $= \frac{(W3 - W1) \times 100}{(W2 - W1)}$			
ค่าเฉลี่ย			

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข-2

การวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งทั้งหมดและปริมาณน้ำในน้ำผึ้ง (AOAC, 2000)

หลักการ

เป็นการหาน้ำหนักที่เหลืออยู่หลังจากการระเหยน้ำ และสารที่ระเหยได้ออกไปจากผลิตภัณฑ์แล้วภายใต้อุณหภูมิที่กำหนด

เครื่องมือ

1. จานอลูมิเนียมมีฝาปิด (moisture can)
2. โถดูดความชื้น (desicator) ที่มีสารดูดความชื้น

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้า ชั่งน้ำหนักได้ละเอียด 0.1 มิลลิกรัม
2. ตู้อบลมร้อนไฟฟ้า

วิธีทำ

1. อบ moisture can พร้อมฝาปิดในตู้อบไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 100±2 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก (W1)
2. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน (2-3 กรัม) ใส่ใน moisture can ที่อบและชั่งน้ำหนักไว้แล้ว (W2)
3. นำ moisture can ที่ใส่ตัวอย่างแล้วไปอบในตู้อบไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 100±2 องศาเซลเซียส โดยเปิดฝาออก อบเป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง
4. นำออกจากตู้อบโดยปิดฝาทันทีและทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักไว้
5. นำเข้าอบต่ออีกครั้งละ 1 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักคงที่ (W3) (น้ำหนักคงที่ หมายความว่าผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 2 มิลลิกรัม)
6. บันทึกข้อมูลและผลการคำนวณลงในแบบบันทึกผลการวิเคราะห์หาของแข็งทั้งหมด ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณของแข็งทั้งหมด ร้อยละของน้ำหนัก $= \frac{(W3 - W1) \times 100}{W2 - W1}$

เมื่อ

W1 = น้ำหนักของ moisture can (กรัม)

W2 = น้ำหนักของ moisture can และตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

W3 = น้ำหนักของ moisture can และตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

ปริมาณน้ำทั้งหมด ร้อยละของน้ำหนัก = 100 – ปริมาณของแข็งทั้งหมด

แบบบันทึกผลการวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมด (Total solid)

น้ำหนักเป็นกรัม	**ครั้งที่ 1**	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**
น้ำหนัก moisture can (W1)			
น้ำหนัก moisture can และตัวอย่างก่อนอบ (W2)			
น้ำหนัก moisture can และตัวอย่างหลังอบ (W3)			
ปริมาณของแข็งทั้งหมด(%) $= \frac{(W3 - W1) \times 100}{W2 - W1}$			
ค่าเฉลี่ย			

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข-3

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Lane and Eynon (ลักขณา และนิธิยา, 2533)

หลักการ

วิธีของ Lane & Eynon เป็นการไตเตรตหาปริมาณของสารละลายน้ำตาลที่เป็นกลาง และผ่านการตกตะกอนจนใส ที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับสารละลาย Fehling reagent จำนวน 10 หรือ 25 มิลลิลิตร และปริมาตรของน้ำตาลจะต้องอยู่ในช่วง 15-50 มิลลิลิตรเท่านั้น

สารเคมี

1. สารละลาย Carrez No.1 เตรียมโดยละลายซิงอะซิเตต (Zinc Acetate dihydrate AR Grade) จำนวน 21.9 กรัม ในน้ำกลั่นที่มีกรดอะซิติก (Acetic Acid glacial AR Grade) จำนวน 3 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร
2. สารละลาย Carrez No.2 เตรียมโดยละลายโพแทสเซียมเฟอโรไซยาไนด์ (Potassium ferrocyanide AR Grade) จำนวน 10.6 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร
3. สารละลาย Fehling No.1 เตรียมได้โดยละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulphate AR Grade) จำนวน 69.278 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร
4. สารละลาย Fehling No.2 เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide NaOH AR Grade) จำนวน 100 กรัม และโซเดียมโพแทสเซียมตาเตรต (Sodium potassium tartrate AR Grade) จำนวน 346 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร
5. สารละลายเมทิลีนบลู (Methylene blue AR Grade) ความเข้มข้น 1%
6. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6.34 นอร์มัล (Hydrochloric Acid AR Grade)
7. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10 นอร์มัล (Sodium hydroxide AR Grade)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีทำ

ชั่งตัวอย่างน้ำผึ้งมาจำนวน 1 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไปพอประมาณให้ตังอย่างละลาย เติม clearing agent คือ สารละลาย Carrez No.1 & No. 2 อย่างละ 5 มิลลิลิตรลงไป เขย่าให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 เก็บสารละลายที่กรองได้ไว้ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ น้ำตาล ดังต่อไปนี้

<u>การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลก่อนการทำอินเวอร์ชั่น</u>

นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่ในบิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร ไล่ฟองอากาศออกให้หมด ปิเปตสารละลาย Felhing No.1 และ No.2 อย่างละ 5 มิลลิลิตรใส่ในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปตั้งบนเครื่อง hot plate stirrer จนเดือดไตเตรทกับสารละลายน้ำตาลตัวอย่างจนสี น้ำเงินจางลง หยดสารละลายเมทิลีนบลูลงไป 1 หยด ไตเตรทจนสีฟ้าหายไปหมด เหลือตะกอนสีส้มแดง จดปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ ถ้าปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้อยู่ในช่วง 15-50 แสดงว่าสารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นเหมาะสม ทำการไตเตรทสารละลายตัวอย่างให้ได้ค่าที่ถูกต้องกับสารละลาย Felhing โดยปล่อยสารละลายน้ำตาลจากบิวเรตลงไปทันที โดยใช้ปริมาตรน้อยกว่าที่ใช้ในการไตเตรทครั้งแรกประมาณ 1-2 มิลลิลิตร ปล่อยให้เดือดนาน 2 นาที หยดสารละลายเมทธิลีนบลู 1 หยดไตเตรทจนสีฟ้าหายไปหมด เหลือตะกอนสีส้มแดง จดปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง นำปริมาตรสารละลายน้ำตาลที่ใช้มาหาค่าเฉลี่ยแล้วนำไปเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลในสารละลายตัวอย่างจากตารางมาตรฐาน

<u>การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลภายหลังการทำอินเวอร์ชั่น</u>

ปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 50 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6.34 นอร์มัล ลงไป 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปไฮโดรไลซ์ใน water bath ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำมาทำให้เย็น แล้วปรับให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มัล แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายตัวอย่างนี้ใส่ลงในบิวเรต ทำการไตเตรทกับสารละลาย Fehling เช่นเดียวกับการหาปริมาณน้ำตาลก่อนอินเวอร์ชั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำตาลซูโครส (%) = (D2 - D1) × 0.95

น้ำตาลทั้งหมด (%) = เปอร์เซ็นต์น้ำตาลซูโครส + D1

เมื่อ D1 = เปอร์เซ็นต์น้ำตาลก่อนการทำอินเวอร์ชั่น

D2 = เปอร์เซ็นต์น้ำตาลภายหลังการทำอินเวอร์ชั่น

ภาคผนวก ข-4

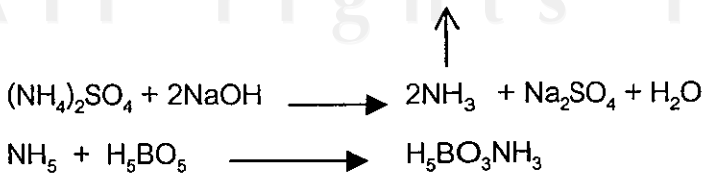
การวิเคราะห์โปรตีน/ไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธีเจลดาห์ล (Kjeldahl Method; AOAC,2000)

โปรตีนเป็นสารประกอบไนโตรเจน คำนวณได้จากปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดคูณกับแฟคเตอร์ ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร

หลักการ

ตัวอย่างจะถูกย่อยด้วยกรดซับฟูริคโดยใช้คอปเปอร์ซัลเฟตและโพแทสเซียมซัลเฟตเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและเพิ่มอุณหภูมิ ไนโตรเจนจะเปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย และทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟูริคได้แอมโมเนียมซัลเฟต ส่วนคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะระเหยออกไป ดังสมการ

เมื่อเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งเป็นด่างแก่ลงไปในแอมโมเนียซัลเฟตและให้ความร้อน แอมโมเนียจะถูกปล่อยออกมาและจะถูกจับในสารละลายกรดบอริค



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำสารละลายที่กลั่นได้ไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริค เพื่อคำนวณปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ส่วนปริมาณโปรตีนคำนวณจากปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดคูณกับแฟคเตอร์ ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เจลดาห์ลฟลาส (Kjeldahl flask) ขนาด 300–500 มิลลิลิตร
2. ชุดกลั่นโปรตีน (Kjeldahl distillation set)
3. ชุดย่อย (Kjeldahl digestion set)
4. ตู้ดูดควัน
5. บิวเรต ขนาด 50 มิลลิลิตร
6. สคูป
7. กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร
8. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริค (H_2SO_4) ความเข้มข้นร้อยละ 98 (w/v)
2. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) ปราศจากไนโตรเจน
3. โพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) ปราศจากไนโตรเจน
4. สารนละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 50 (w/v)
5. สารละลายมาตราฐานกรดซัลฟูริค ความเข้มข้น 1 นอร์มอล มีอายุการเก็บรักษา 1 เดือน หากครบกำหนดเวลาแล้วยังมีสารละลายมาตรฐานนี้เหลือมากพอสำหรับใช้งาน ให้นำไปหาความเข้มข้นใหม่ (restandardize) หรือนำไปใช้งานอื่นที่ไม่ต้องการทราบค่าความเข้มข้นแน่นอน
6. อินดิเคเตอร์ผสม (mix indicator) ประกอบด้วยสารละลายเมธิลเรด (methyl red) ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (w/v) ในแอลกอฮอล์ผสมกับสารละลายโบรโมครีซอลกรีน (bromocresol green) ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (w/v) ในแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 1:5
7. สานละลายกรดบอริค ความเข้มข้นร้อยละ 4 (w/v)

วิธีทำ

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างแน่นอนใส่ลงในสคูป 0.5-2.0 กรัม และชั่งน้ำหนัก (W1) ถ่ายตัวอย่างลงในฟลาสเจดาห์ล แล้วชั่งน้ำหนักสคูปที่ถ่ายตัวอย่างออกแล้ว (W2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. เติมคอปเปซัลเฟต จำนวน 0.5 กรัม และโพแทสเซียมซัลเฟต จำนวน 15 กรัม
3. เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 25 มิลิลิตร โดยเอียงขวดแล้วค่อยๆ รินกรดลงด้านข้างโดยรอบ เพื่อให้กรดชะล้างตัวอย่างที่อาจติดอยู่ด้านข้างลงไปให้หมด เขย่าเบาๆ ปิดปากฟลาส
4. นำไปย่อยในตู้ดูดควัน ปรับความร้อนให้อยู่ที่ระดับ 4 นาน 15 นาที แล้วเพิ่มความร้อนเป็นระดับ 5 ย่อยนาน 1 ชั่วโมง แล้วเพิ่มความร้อนขึ้นอีกครั้งโดยปรับความร้อนที่ระดับ 10 ย่อยต่ออีก 2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสารละลายใสจึงปิดชุดย่อย รอจนสารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายสีเขียวใส
5. นำฟลาสเจลดาห์ลไปต่อกับเครื่องกลั่นโปรตีน โดยนำขวดรูปชมพู่ ที่มีกรดบอริกปริมาตร 50 มิลลิลิตร และหยดอินดิเคเตอร์ผสมลงไป 3-5 หยด เพื่อรองรับแอมโมเนียที่ได้จากการกลั่น
6. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้มีปริมาณมากเกินพอ ประมาณ 60 มิลลิลิตร
7. เปิดเครื่องกลั่น โดยกลั่น Blank ก่อนกลั่นตัวอย่าง
8. นำสารละลายที่กลั่นได้ไปไทเทรตกับสารละลายมาตราฐานกรดซัลฟูริค จนได้จุดยุติ คือเกิดสารละลายสีชมพู และสารละลายสีเทาอมม่วง
9. บันทึกข้อมูล การคำนวณ และผลการคำนวณลงในแบบบันทึกผลการวิเคราะห์โปรตีน/ไนโตรเจนทั้งหมด
10. คำนวณหาปริมาณ ไนโตรเจน ทำได้ดังนี้

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน ร้อยละของน้ำหนัก} = \frac{[(Vs - Vb) \times N_{H2SO4} \times 1.4007]}{W1 - W2}$$

เมื่อ

Vs = ปริมาณของสารละลายมาตราฐานกรดซัลฟูริคที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่างเป็นมิลลิลิตร

Vb = ปริมาณของสารละลายมาตราฐานกรดซัลฟูริคที่ใช้ในการไตเตรต blank เป็นมิลลิลิตร

N_{HSO4} = ความเข้มข้นของสารละลายมาตราฐานกรดซัลฟูริค เป็นนอร์มอล

W1 = น้ำหนักสคูปและตัวอย่าง เป็นกรัม

W2 = น้ำหนักสคูปที่ถ่ายตัวอย่างออกแล้ว เป็นกรัมปริมาณของสารละลายมาตราฐานกรดซัลฟูริคที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่างเป็นมิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แบบบันทึกผลการวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมด

	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
น้ำหนักของสคูปและตัวอย่าง (W1)			
น้ำหนักของสคูป (W2)			
น้ำหนักของตัวอย่าง (W1 –W2 = W3)			
ปริมาตรของกรดซัลฟูริคสำหรับตัวอย่าง (Vs)			
ปริมาตรของกรดซัลฟูริคสำหรับ blank (Vb)			
ปริมาณไนโตรเจน(%) = $\frac{[(Vs- Vb) \times N_{H2SO4} \times 1.4007]}{W1 - W2}$			
ค่าเฉลี่ย			

ภาคผนวก ข-5

การวิเคราะห์หาความเป็นกรดด่าง (AOAC, 2000)

ชั่งตัวอย่างจำนวน 10.0 กรัม นำไปปั่นให้ละเอียดกับน้ำกลั่นจำนวน 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 นาที โดยใช้เครื่องบดผสมอาหาร (“National, Model MXT31GN) นำไปวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (“Orion”, Model 520A) ซึ่งได้มีการปรับค่ามาตรฐานด้วยสารละลายมาตรฐานที่มี pH เท่ากับ 4.00 และ 7.00 ตามลำดับแล้ว

ภาคผนวก ข-6

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมด (Total titrable acidity) AOAC(1998)

สารเคมี

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ โดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

วิธีวิเคราะห์

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างน้ำผึ้ง 10 กรัม ปรับปริมาตรให้ครบ 100มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำตัวอย่างน้ำผึ้งที่เตรียมได้มากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นปิเปตสารลำลายใส 10 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร นำมาไตรเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ โดยใช้ฟีนอฟธาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ คำนวนหาปริมาณกรดทั้งโดยเทียบจากค่ามาตรฐาน ดังนี้ คือ 1มิลลิลิตร ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ ทำปฏิกิริยาสมมูลย์พอดีกับกรดแลคติค 0.009 กรัม

ภาคผนวก ข-7

การตรวจวัดปริมาณสารไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในน้ำผึ้งลำไย น้ำผึ้งสาบเสือ และน้ำผึ้งขี้ไก่ย่าน

ตรวจวัดปริมาณสารไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในน้ำผึ้งลำไยที่ระดับความเจือจางเท่ากับร้อยละ 30 35 และ 40 น้ำผึ้งสาบเสือและน้ำผึ้งขี้ไก่ย่านที่ระดับความเจือจางร้อยละ 30 35 40 45 50 และ 55 โดยใช้ชุดตรวจสอบ ควอนโทฟิกซ์ เปอร์ออกไซด์ 25

วิธีทำ

1. เจือจางน้ำผึ้งลำไย น้ำผึ้งสาบเสือ และน้ำผึ้งขี้ไก่ย่าน ให้ได้ระดับที่กำหนด ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 20 องศาเซลเซียส โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย ทิ้งระยะเวลาให้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเร่งปฏิกิริยาสร้างไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ภาพที่ ก-2)
2. จุ่มกระดาษทดสอบลงในน้ำผึ้งที่ระดับความเจือจางต่างๆ อย่างรวดเร็วเพียง 1 วินาที
3. สลัดน้ำที่เกาะทิ้ง
4. หลังจากนั้นประมาณ 15 วินาที นำกระดาษทดสอบไปเปรียบเทียบกับแถบสีข้างหลอดอลูมิเนียม เพื่ออ่านค่า (ภาพที่ ก-3 และ ก-4)

ข้อควรระวัง

1. เมื่อหยิบกระดาษทดสอบออกจากหลอดอลูมิเนียมตามจำนวนที่ต้องการใช้แล้ว ควรรีบปิดฝาหลอดให้สนิท ระวังอย่าจับถูกส่วนปลายของกระดาษทดสอบ
2. การเก็บรักษา ให้เก็บในที่เย็นและแห้ง หลีกเลี่ยงแสงแดดและที่ชื้น หากยังไม่เปิดใช้ควรเก็บในตู้เย็น

หมายเหตุ

1. ถ้ามีเปอร์ออกไซด์ แถบปฏิกิริยาจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. โดยทั่วไปถ้าสารตัวอย่างมีค่าความเป็นกรดด่าง 2-12 การอ่านค่าจะมีความเที่ยงตรง แต่หากสารตัวอย่างมีความเป็นกรดสูง ต้องปรับค่าความเป็นกรดด่างก่อนโดยเติม โซเดียมอะซิเตด (sodium acetate) ลงไป หรือถ้าหากมีความเป็นด่างสูง ต้องปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ประมาณ 5-7 โดยการเติมกรดอะซิติก (acetic acid)
3. ถ้าต้องการทดสอบเปอร์ออกไซด์ ในสารตัวอย่างที่เป็นสารออร์กานิก (organic solvent) ต้องระวังให้แถบปฏิกิริยาชุ่มชื้นอยู่เสมอ โดยหยดน้ำ 1 หยด หลังจากจุ่มแถบกระดาษในสารตัวอย่างแล้วมีการระเหยจนแห้งเกินไป

การวิเคราะห์คุณภาพด้านกายภาพ

ภาคผนวก ข-7

การวัดสีระบบ Hunter Lab(Hunter Lab, 1997)

เป็นการวัดสีด้วยเครื่องวัดสี ColorQuest II ผลิตโดย Hunter Laboratory Inc. สหรัฐอเมริกา เครื่องวัดสีนี้ต้องต่อเข้ากับคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล IBM PC compatible ที่พอร์ตอนุกรม (Serial port) เพื่อควบคุมการทำงานของเครื่องวัดสี การเปิดเครื่อง ต้องเปิดเครื่องวัดสีก่อนเปิดเครื่องคอมพิวเตอร์ เพื่อให้เครื่องคอมพิวเตอร์ตรวจจับเครื่องวัดสีได้ก่อนการใช้งาน ในคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคลที่ต่อกับเครื่องวัดสีต้องมีโปรแกรมใช้งานเครื่องวัดสีติดตั้งอยู่ด้วย เครื่องวัดสีนี้วัดได้หลายระบบ ได้แก่ Hunter Lab, CIE L a* b*, RGB, CMYK และ XYZ สามารถวัดค่าสีของตัวอย่างได้ทั้งแบบสะท้อนแสงและแบบโปร่งแสง

การ Calibrate เครื่องวัดสี

ก่อนใช้งานต้องทำการ Calibrate เครื่องวัดสีก่อน โดยการตรวจเช็คการวัดสีให้เป็นแบบ R-sin คือการวัดแบบสะท้อนแสง แล้วคลิกที่ปุ่ม Calibrate นำแผ่นกระเบื้องมาตรฐาน สีขาว มาวางที่ช่องวัดสี คลิก OK นำแผ่นกระเบื้องสีเทาเพื่อยืนยันการ Calibrate มาวางช่องวัดสี คลิก OK เครื่องวัดสีวัดสีพร้อมใช้งานแล้ว

การวัดสีตัวอย่างน้ำผึ้ง

ปรับรูปแบบการวัดสีเป็นแบบ R-sin (แบบสะท้อนแสง) เลือกระบบวัดสีแบบ Hunter Lab ตักตัวอย่างน้ำผึ้งใส่เซลล์วัดสี แล้วนำเซลล์วัดสีไปวางไว้ที่ช่องวัดสี คลิกปุ่ม sample บนจอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คอมพิวเตอร์ หรือกดปุ่ม F3 บนคีย์บอร์ด คอมพิวเตอร์จะสั่งให้เครื่องวัดสีส่งข้อมูลของสีตัวอย่างน้ำผึ้งที่วัดได้ มายังคอมพิวเตอร์ กรอกหมายเลขตัวอย่างในช่องใส่หมายเลขตัวอย่าง คลิก OK ค่าสีของตัวอย่างน้ำผึ้งจะปรากฏบนตารางบันทึกค่าสี

วัดค่าสีในระบบฮันเตอร์ (Hunter Lab) โดยค่าสี L เป็นค่าความสว่าง (Lightness) มีค่าอยู่ในช่วง 0 ถึง 100 ซึ่งค่า L น้อยหมายถึงตัวอย่างมีความสว่างน้อย ค่า L มีค่ามาก หมายถึงตัวอย่างมีความสว่างมาก ค่า a เป็นค่าสีแดงและสีเขียว (Redness/ Greenness) เมื่อ a มีค่าเป็นบวก ตัวอย่างจะมีโทนสีแดง เมื่อค่า a เป็นลบตัวอย่างจะมีโทนสีเขียว และค่า b เป็นค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (Yellowness/Blueness) เมื่อ b มีค่าเป็นบวก ตัวอย่างจะมีโทนสีเหลือง เมื่อ b มีค่าลบ ตัวอย่างจะมีโทนสีน้ำเงิน

ภาคผนวก ข-8

การวัดความหนืดของน้ำผึ้ง

หลักการพื้นฐานการหาค่าความหนืด

ความหนืด (viscosity ; η) เป็นแรงต้านทานภายในของของเหลว ซึ่งเกิดจากแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลของของเหลวต้านทานต่อการไหล ซึ่งหาค่าได้จากอัตราส่วนระหว่างความเค้นเฉือนกับอัตราเฉือน ดังสมการ

$$\text{ความหนืด (viscosity; } \eta) = \frac{\text{แรงเฉือน}}{\text{อัตราเฉือน}} = \frac{\text{Shear Stress}}{\text{Shear Rate}}$$

ความหนืด มีหน่วยเป็น centipoise; cP หรือ mPas.sec ซึ่ง 1 cP = 1 mPas.sec

Isaac Newton ได้เสนอภาพจำลองเพื่อใช้ในการพิจารณาความหนืด พิจารณาระบบของของเหลวที่อยู่ระหว่างแผ่นระนาบ (plate) ที่ขนานกัน 2 แผ่น เมื่อมีการเคลื่อนที่ ของเหลวระหว่างแผ่นระนาบจะเคลื่อนที่โดยชั้นบนสุดของของเหลวที่ติดกับแผ่นระนาบจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วสูงสุด เปรียบเทียบได้กับการเคลื่อนของของเหลวที่ติดอยู่กับ spindle ส่วนชั้นล่างที่ติดกับแผ่นระนาบที่อยู่ติดกับที่จะมีความเร็วต่ำสุดเท่ากับศูนย์เปรียบได้กับของเหลวที่ติดอยู่กับภาชนะ เรียกการไหลของของเหลวแบบนี้ว่าเป็นการไหลแบบ laminar flow ความเร็วของหัว spindle ของเครื่องวัจะต้องไม่เร็วมากเกินไปหรือน้อยเกินไปเพราะจะทำให้ของเหลวมีการไหลไม่เป็น laminar flow

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความหนืดปรากฏหรือความคงตัว

ความหนืดปรากฏ (η_a) เป็นค่าความหนืดของของไหลชนิด non-Newtonian ซึ่งค่าความหนืดที่หาจะแปรเปลี่ยนไปตามอัตราเฉือน เช่น ซอสมะเขือเทศ ค่าวัดความหนืดจะเปลี่ยนไปเมื่อเปลี่ยนขนาดของ spindle และความเร็ว (speed) ในการวัด โดยความหนืดจะลดลงเมื่อเพิ่ม speed สูงขึ้น ค่าความหนืดที่ได้แต่ละจุดเป็นค่าเฉพาะที่สภาวะนั้นๆ ไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ว่าค่าใดถูกต้องมากกว่ากัน

การไหลของของเหลว (Fluid Flow)

แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

1. Newtonian
2. Non-Newtonian
   - 2.1 Time-Independent Non-Newtonian
     - 2.1.1 Plastic (Bingham Plastic)
     - 2.1.2 Pseudoplastic
     - 2.1.3 Dilatant
   - 2.2 Time-Dependent Non-Newtonian
     - 2.2.1 Thixotropy
     - 2.2.2 Rheopexy

1. Newtonian

Newtonian fluid คือของเหลวที่มีพฤติกรรมการไหลเป็นไปตามกฎของนิวตัน ดังสมการ

$$\eta = \tau / \dot{\gamma}$$

ค่าความหนืดที่ได้จะคงที่ไม่ขึ้นกับอัตราเฉือน (หรือ speed ที่ใช้วัด) สารในกลุ่มนี้ได้แก่ น้ำ น้ำมัน น้ำผึ้ง สารละลาย เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. Non-Newtonian

Non-Newtonian fluid คือของเหลวที่ค่าความหนืดขึ้นอยู่กับอัตราเฉือน ดังนั้น อัตราส่วนระหว่างแรงเฉือนและอัตราเฉือนจะไม่คงที่ นั่นคือ ความหนืดที่ได้จะมีค่าไม่คงที่ ความหนืดที่ได้จึงเรียกว่า *ความหนืดปรากฏ (Apparent viscosity)* และมีความสัมพันธ์ ดังสมการ

$$\eta_a = \tau / \dot{\gamma}$$

โดย η_a คือ ความหนืดปรากฏ หรือความหนืด ณ สภาวะนั้นๆ เมื่อมีการเปลี่ยน rpm หรือ speed หรือขนาดของ spindle จะทำให้ค่าความหนืดเปลี่ยนไป ดังนั้นในการวัดความหนืดควรทดลองทุก spindle แล้วหา speed ที่เหมาะสม โดย 1spindle จะมีค่า rpm ที่เหมาะสมอยู่หนึ่งค่าเสมอ

2.1 Time-Independent Non-Newtonian

2.1.1 **Plastic (Bingham Plastic)** เป็นของไหลที่ต้องการแรงเริ่มต้นค่าหนึ่งเพื่อทำให้ของเหลวนั้นไหลได้ เรียกแรงกระทำนี้ว่า *Yield Value* ของเหลวในกลุ่มนี้ได้แก่ ยาสีฟัน ลิปสติก ซอสมะเขือเทศ

2.1.2 **Pseudoplastic** เป็นของเหลวที่มีความหนืดลดลงเมื่ออัตราเฉือนเพิ่มขึ้น เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า *Shear Thinning* ของเหลวในกลุ่มนี้ ได้แก่ สี ครีม แชมพู เมื่ออัตราเฉือนหรือ speed เพิ่มขึ้น จะทำให้ค่าความหนืดลดลง

2.1.3 **Dilatant** เป็นของไหลที่มีความหนืดสูงขึ้นเมื่ออัตราเฉือนเพิ่มขึ้น หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า *Shear Thickening* สารในกลุ่มนี้ได้แก่ แป้งข้าวโพดในน้ำ ลูกกวาด สารแขวนลอย เป็นต้น

2.2 Time-Dependent Non-Newtonian

2.2.1 **Thixotropic** เป็นของไหลที่มีความหนืดลดลงเมื่อเวลาผ่านไป โดยที่อัตราเฉือนคงที่ และหากมีการเปลี่ยนแปลงอัตราเฉือนเพิ่มขึ้นต้องใช้แรงเฉือนที่กระทำต่อของไหลมากขึ้นด้วย ค่าความหนืดที่ได้จะลดลงเนื่องจากอัตราแรงเฉือนมีค่าลดลง สารในกลุ่มนี้ได้แก่ น้ำปูน น้ำดิน เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2 Rheopexy เป็นของไหลที่มีความหนืดเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปโดยที่อัตราเฉือนคงที่ (ยังไม่เคยพบของเหลวชนิดนี้) ในการวัดหาความหนืดจะต้องกำหนดขนาดของ spindle, speed และจับเวลาในการวัดด้วย

วิธีการตรวจสอบชนิดของสารที่เป็น Time-Dependent หรือ Time-Independent

แบ่งตัวอย่างของไหลออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่หนึ่ง ให้วัดค่าความหนืดโดยค่อยๆ เพิ่ม speed ในการวัดอย่างสม่ำเสมอ เช่น 5, 10, 15, 20.... และ ส่วนที่สองให้วัดค่าความหนืดโดยค่อยๆ ลด speed ในการวัดลงอย่างสม่ำเสมอ เช่น 20, 15, 10, 5 จากนั้นนำค่าความหนืดที่วัดได้ไป plot กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดกับอัตราเฉือน ถ้ากราฟทั้ง 2 เส้นซ้อนทับแสดงว่าเป็นของไหลแบบ time-independent แต่ถ้าเส้นกราฟไม่ซ้อนทับกันจะเป็นของไหลแบบ time-dependent ซึ่งการวัดความหนืดจะต้องจับเวลาเสมอในการวัดเสมอ

<u>ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อค่าความหนืด</u>

1. ขนาดของหัว spindle
2. ความเร็วรอบ (speed) ที่ใช้ในการวัด
3. เวลา
4. ภาชนะบรรจุ จะมีผลต่อพื้นที่ที่เกิด shear stress
5. ปริมาตรของตัวอย่าง
6. อุณหภูมิของตัวอย่าง โดยค่าความหนืดจะเปลี่ยนไป 10% ของค่าความหนืดที่ถูกต้องเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนไป 1 องศาเซลเซียส

เครื่องวัดความหนืด BROOKFIELD DV-II+ PROGRAMMABLE

ประกอบด้วยหัววัด (spindle) 2 ชุด คือ

1. LV Spindle Set ประกอบด้วยหัววัด 4 ขนาดคือ
   - 1.1 หัววัดเบอร์ 1
   - 1.2 หัววัดเบอร์ 2
   - 1.3 หัววัดเบอร์ 3
   - 1.4 หัววัดเบอร์ 4
2. Small Sample Set มีหัววัดเบอร์ 18

ขนาดของ หัววัดจะมีผลค่าความหนืด เมื่อของเหลวเป็นแบบ Non-Newtonian แต่ถ้าของไหลแบบ Newtonian ขนาดของหัววัดจะไม่มีผลต่อค่าความหนืดที่วัดได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลักการวัดของเครื่อง

ใช้การขับเคลื่อนของหัวเข็มวัดผ่านสปริงมาตรฐาน ความหนืดของของเหลวจะต้านทานการหมุนของหัวเข็มวัด ทำให้เกิดความเบี่ยงเบนของสปริงมาตรฐาน (spring deflection) แล้วนำไปคำนวณเป็นค่าความหนืดได้ โดยความเบี่ยงเบนของสปริงมาตรฐานจะถูกวัดด้วย rotary transducer การวัดค่าความหนืดของ DV-II+ ในหน่วยเซนติพอยส์หรือมิลลิปาสคาล์ วินาที (centipoise or miliPascal seconds) จะตรวจวัดด้วยความเร็วรอบของการหมุนของหัวเข็มวัด (spindle) , ขนาดและรูปร่างของหัวเข็มวัด, ภาชนะบรรจุตัวอย่างที่หัวเข็มวัดหมุนและ full scale torque ของ calibrated spring

Spring Torque Series พื้นฐานของเครื่อง BROOKFIELD มีอยู่ 4 แบบ คือ

Model	Spring Torque	
	Dyne-cm	Mili Newton-m
1. LVDV-II+	673.7	0.0673
2. RVDV-II+	7,187.0	0.7187
3. HADV-II+	14,374.0	1.4374
4. HBDV-II+	57,496.0	5.7496

<u>หน่วยของการวัด</u>

1. ความหนืด แสดงเป็นหน่วย centipoise (cP) หรือ miliPascal seconds (mPa.s)
2. Shear Stress แสดงในหน่วย dynes/square centimeter (D/cm^2) หรือ Newtons/square centimeter (N/cm^2)
3. Shear Rate แสดงในหน่วย 1/second (1/Sec)
4. Torque แสดงในหน่วยเป็น %dynes-centimeter หรือ %Newtons- centimeter

<u>วิธีการตรวจสอบเครื่องวัดความหนืด</u>

1. ใส่เข็มเบอร์ 3 ใช้ความเร็ว 10-12 rpm ปล่อยให้เข็มหมุนในอากาศ แล้วนำกระดาษขาววางเป็นฉากด้านหลังของเข็ม หัวเข็ม ไม่ควรแกว่งไป-มา ถ้าเข็มแกว่งอาจมีสาเหตุจากแกนของเครื่องบิดงอ หรือหัวเข็มบิดงอ นอกจากนี้อาจเกิดจากจุดที่ต่อเชื่อมระหว่างเครื่องกับเข็มสกปรก หรือใส่เข็มไม่แน่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ตรวจสอบ %Torque โดยเอามือจับที่เข็มแล้วปล่อย อ่านค่า %Torque ค่า error ที่ยอมรับได้ คือ -0.03 ถึง 0.3

การวัดความหนืดของตัวอย่างน้ำผึ้ง

1. ปรับระดับลูกน้ำ และปรับศูนย์ของเครื่อง (autozero) โดยกดปุ่มใดปุ่มหนึ่งบนเครื่อง เครื่องจะปรับศูนย์อัตโนมัติ ซึ่งก่อนที่จะปรับ autozero จะต้องถอด cap และ spindle ออกจาก
2. เตรียมตัวอย่างน้ำผึ้ง โดยใช้บีกเกอร์ ขนาดบรรจุ 600 มิลลิลิตร (ทรงเตี้ยเท่านั้น) ใส่น้ำผึ้งตัวอย่างปริมาณ 500 มิลลิลิตร
3. ใส่หัวเข็มวัดโดยจับ screw ของเครื่องไว้ให้แน่นด้วยมือซ้าย แล้วใส่หัวเข็มวัดด้วยมือขวาหมุนตามเข็มนาฬิกาจนแน่นพอดี
4. จุ่มหัวเข็มวัดลงในตัวอย่างจนถึงระดับ “mark” ของหัวเข็มวัด
5. ป้อนข้อมูลของหัวเข็มวัดโดย
6. กดปุ่ม select spindle
7. กดปุ่มลูกศรขึ้น-ลงเพื่อเลือกเบอร์รหัสของหัวเข็มวัด
8. กดปุ่ม select spindle อีกครั้งเพื่อเป็นการ enter รับข้อมูล ภายในเวลา 3 วินาที
9. เลือกความเร็วรอบในการวัด โดย
10. กดปุ่มลูกศรขึ้น-ลงเพื่อเลือกความเร็วรอบที่ต้องการ
11. กดปุ่ม select speed เพื่อเป็นการ enter รับข้อมูล ภายในเวลา 3 วินาที
12. ทำการวัดตัวอย่างโดยกดปุ่ม Motor ON/OFF

<u>การบำรุงรักษา และข้อควรระวัง</u>

- ควรติดตั้งในที่เหมาะสม เช่น ในที่ที่อุณหภูมิไม่เปลี่ยนแปลงมาก และพื้นที่สำหรับตั้งเครื่องควรเป็นที่ราบเรียบ
- ควรปิดมอเตอร์ (motor off) ทุกครั้งก่อนและหลังการใส่เข็มทุกครั้ง
- การใส่เข็มติดกับเครื่องควรยก spindle coupling ขึ้นและหมุนเข็มในทิศทางตามเข็มนาฬิกา
- ควรใส่ guard leg เพื่อป้องกันปลายเข็มกระแทกก้นภาชนะ ซึ่งอาจจะทำให้เครื่องเสียหายได้
- การทำความสะอาดเข็ม ให้ใช้ฟองน้ำนุ่มๆ ล้างทำความสะอาด ห้ามใช้สก็อตไบท์ หรือแปรงขนแข็งขัดหรือล้างทำความสะอาดเข็ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์

ภาคผนวก ข-9

การตรวจหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นทั้งหมด

เครื่องมือและเครื่องแก้ว

1. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
2. หลอดทดลองขนาด 15x160 มิลลิเมตร
3. ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร
4. เครื่องชั่งความละเอียด 1.01 กรัม
5. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 50 องศาเซลเซียส
6. ตู้บ่มเพาะเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส
7. Anaerobic jar (Merch, Germany)
8. สารจับออกซิเจน Anaerocult A (Merck, Germany)

สารละลายสำหรับเจือจาง

1. สารละลายสำหรับเจือจาง สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (NaCl, Merck, Germany) (มอก. 335/1-2553)
2. อาหาร Plate count agar (Merck, Germany)

วิธีการวิเคราะห์

<u>1. วิธีการเตรียมตัวอย่างอาหาร</u>

1.1 ใช้ช้อนที่ปราศจากเชื้อ ตักตัวอย่างอาหารใส่ในขวดที่มีสารละลายเจือจาง 90 มิลลิลิตร บนเครื่องชั่ง ชั่งจนได้น้ำหนัก 10 กรัม เขย่าขวดขึ้นลงอย่างแรง ระยะการเขย่า 60 เซนติเมตร 20 ครั้ง จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:10

1.2 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1:10 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบที่มีสารละลายสำหรับเจือจาง 9 มิลลิลิตร จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:100 (10^{-2})

1.3 เจือจางตัวอย่างอาหารจนได้ความเจือจาง 1:1,000,000 (10^{-6})

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การเพาะเชื้อตัวอย่างอาหาร

2.1 ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายของตัวอย่างอาหารที่เจือจางที่ (10^{-6}) ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.2 ทำการ pour plate สารละลายให้ทั่วจาน ทิ้งไว้จนหน้าวุ้นแห้ง คว่ำจานเพาะเชื้อ

3. การบ่มเชื้อ

นำจานเพาะเชื้อใส่ลงใน Anaerobic jar ใส่สารจับออกซิเจนลงไป แล้วปิดฝาให้สนิท นำไปบ่มในตู้เพาะเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4. การนับโคโลนีและการรายงานผล

ตัวอย่างน้ำผึ้งบน MRS agar หลังบ่มเชื้อตามกำหนดเวลาแล้วตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยจากจำนวนโคโลนีในการทำซ้ำ รายงานผลการตรวจนับเป็นจำนวนเชื้อเริ่มต้นในรูปของจำนวนโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม (CFU/g) หรือ $\log_{10}$ ของจำนวนโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม (log CFU/g)

ภาคผนวก ข-10

การย้อมสีแกรม (Gram's stain)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ห่วงถ่ายเชื้อ
2. แผ่นสไลด์
3. สารละลาย crystal violet
4. สารละลาย gram's iodine
5. สารละลาย ethanol ร้อยละ 95
6. สารละลาย safranino carbon fuchsin
7. กล้องจุลทรรศน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการย้อมสีแกรม (เรณู. 2537)

1. ใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะน้ำสะอาดลงบนแผ่นสไลด์ จำนวน 1 ห่วง
2. ใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะเชื้อจากน้ำผึ้งลงบนหยดน้ำบนสไลด์ เกลี่ยให้กระจาย
3. ปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้วนำไปผ่านเปลวไฟ ประมาณ 1 วินาที
4. หยดสารละลาย crystal violet ลงให้ท่วมรอยที่เกลี่ยทิ้งไว้นาน 30 วินาที เทสารละลายทิ้งด้วยน้ำสะอาด
5. หยดสารละลาย gram's iodine ลงให้ท่วมรอยที่เกลี่ยทิ้งไว้นาน 30 วินาที เทสารละลายทิ้ง ล้างด้วยน้ำสะอาด
6. ล้างด้วยสารละลาย ethanol ร้อยละ 95 อย่างรวดเร็ว จนไม่มีสีน้ำเงินของสารละลาย crystal violet ออกมาแต่ต้องไม่เกิน 20 วินาที ล้างด้วยน้ำสะอาด
7. หยดสารละลาย safranino carbon fuchsin ลงให้ท่วมรอยที่เกลี่ยทิ้งไว้นาน 5 วินาที เทสารละลายทิ้งล้างด้วยน้ำ ซับน้ำออกให้แห้ง
8. นำไปตรวจลักษณะของเซลล์จุลินทรีย์ที่ติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกลักษณะการติดสีแกรมและรูปร่างลักษณะของเซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค
ตารางผลการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ ค-1 ร้อยละของจำนวนเชื้อ *E. aerogenes* ที่เหลือรอดในน้ำผึ้งสาบเสือที่ระดับความเจือจางและเวลาที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ระดับความเจือจางของน้ำผึ้ง (ร้อยละ)		
	30	35	40
0	100±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
1	97.86±0.01	97.35±0.34	96.15±0.27
2	95.42±0.57	94.34±1.36	94.89±0.80
4	93.46±0.15	91.21±1.18	91.61±0.80
8	91.68±0.19	89.22±1.26	89.72±0.80
12	90.25±0.20	84.77±1.26	87.14±0.53
18	89.18±0.20	82.90±0.67	89.34±0.44
24	91.14±0.39	85.43±0.33	90.79±0.53

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย + จากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

ตารางที่ ค-2 ร้อยละของจำนวนเชื้อ *E. aerogenes* ที่เหลือรอดในน้ำผึ้งขี้ไก่ย่านที่ระดับความ เจือจางและเวลาที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ระดับความเจือจางของน้ำผึ้ง (ร้อยละ)		
	30	35	40
0	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
1	95.56±0.46	94.32±0.72	95.16±0.38
2	93.99±0.99	92.60±0.24	93.00±0.52
4	92.32±0.91	89.74±1.70	90.15±0.19
8	90.10±0.84	88.13±0.08	89.58±0.29
12	88.42±0.31	87.16±0.97	87.70±1.06
18	89.07±0.15	87.16±0.97	88.21±0.66
24	87.39±0.53	86.75±0.08	87.30±0.18

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย + จากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ ค-3 ร้อยละของจำนวนเชื้อ *E. aerogenes* ที่เหลือรอดในน้ำผึ้งลำไยที่ระดับความ เจือจางและเวลาที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ระดับความเจือจางของน้ำผึ้ง (ร้อยละ)		
	30*	35	40
0	-	100.00±0.00	100.00±0.00
1	-	97.62±0.33	98.70±0.33
2	-	95.95±0.16	96.15±1.42
4	-	98.33±0.17	97.87±1.67
8	-	97.20±0.42	95.44±0.58
12	-	96.25±0.25	93.67±0.58
18	-	97.32±0.25	92.19±0.66
24	-	97.74±0.50	91.12±1.16

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย + จากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

* ไม่มีข้อมูล เนื่องจากการศึกษาในตอนที่ 2 ไม่ปรากฏผลการยับยั้งจุลินทรีย์โดยน้ำผึ้งลำไยที่ระดับความเจือจางร้อยละ 30 ดังนั้นจึงไม่มีการนำมาศึกษาต่อในตอนที่ 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ ค-4 ร้อยละของจำนวนเชื้อ *S. marcescens* ที่เหลือรอดในน้ำผึ้งสาบเสือที่ระดับความ เจือจางและเวลาที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ระดับความเจือจางของน้ำผึ้ง (ร้อยละ)		
	30	35	40
0	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
1	85.48±0.90	87.08±0.21	82.44±3.84
2	84.62±1.45	85.80±0.81	79.00±1.67
4	84.86±1.56	83.50±0.28	74.10±2.92
8	82.57±1.42	79.00±0.65	67.96±1.75
12	81.78±1.18	76.79±1.50	65.93±2.42
18	80.44±1.94	76.45±0.18	64.77±0.78
24	80.12±1.27	77.47±0.55	64.93±1.00

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย + จากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

ตารางที่ ค-5 ร้อยละของจำนวนเชื้อ *S. marcescens* ที่เหลือรอดในน้ำผึ้งขี้ไก่ย่านที่ระดับความเจือจางและเวลาที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ระดับความเจือจางของน้ำผึ้ง (ร้อยละ)		
	30	35	40
0	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
1	97.76±1.51	88.04±0.17	92.12±0.52
2	95.74±2.51	84.91±0.06	88.99±0.16
4	92.91±0.53	82.13±0.13	87.11±0.25
8	88.85±0.69	80.67±0.74	83.97±0.54
12	90.45±1.32	75.10±0.15	73.45±0.22
18	93.05±0.12	73.37±0.05	73.45±0.61
24	90.73±0.10	72.95±0.24	73.10±0.90

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย + จากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ ค-6 ร้อยละของจำนวนเชื้อ *S. marcescens* ที่เหลือรอดในน้ำผึ้งลำไยที่ระดับความเจือจางและเวลาที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ระดับความเจือจางของน้ำผึ้ง (ร้อยละ)		
	30	35	40
0	-	100.00±0.00	100.00±0.00
1	-	93.93±1.02	96.16±0.49
2	-	102.51±1.06	94.28±0.39
4	-	99.93±1.48	92.82±0.69
8	-	100.01±0.91	89.33±2.66
12	-	97.26±1.10	89.54±1.18
18	-	99.92±0.79	90.59±0.29
24	-	99.92±0.50	89.26±0.78

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย + จากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

* ไม่มีข้อมูล เนื่องจากการศึกษาในตอนที่ 2 ไม่ปรากฏผลการยับยั้งจุลินทรีย์โดยน้ำผึ้งลำไยที่ระดับความเจือจางร้อยละ 30 ดังนั้นจึงไม่มีการนำมาศึกษาต่อในตอนที่ 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ ค-7 ร้อยละของจำนวนเชื้อ *P.fluorescens* ที่เหลือรอดในน้ำผึ้งสาบเสือที่ระดับความเจือจางและเวลาที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ระดับความเจือจางของน้ำผึ้ง (ร้อยละ)		
	45	50	55
0	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
1	94.44±0.86	92.14±0.67	91.78±0.02
2	93.17±0.93	89.47±0.18	87.55±0.22
4	90.48±0.27	87.78±0.33	83.51±0.21
8	88.76±0.74	86.33±0.50	81.79±0.38
12	88.18±0.58	84.39±0.18	79.15±0.11
18	87.55±0.49	80.64±0.83	75.66±0.54
24	86.75±0.48	78.04±0.24	70.20±0.79

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย + จากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

ตารางที่ ค-8 ร้อยละของจำนวนเชื้อ *P. fluorescens* ที่เหลือรอดในน้ำผึ้งขี้ไก่ย่านที่ระดับความเจือจางและเวลาที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ระดับความเจือจางของน้ำผึ้ง (ร้อยละ)		
	45	50	55
0	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
1	95.69±1.61	95.69±0.16	93.01±0.09
2	89.23±2.48	92.70±0.76	89.95±0.50
4	88.35±1.57	88.12±0.82	86.66±0.59
8	84.15±0.06	86.46±0.14	83.37±0.35
12	83.74±0.14	85.33±0.56	81.24±0.03
18	82.46±1.45	83.20±0.39	76.44±1.50
24	82.52±1.03	78.50±0.87	73.15±0.28

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย + จากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวชลดา เอี่ยมสอาด
วัน เดือน ปี เกิด	5 สิงหาคม 2523
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสุรธรรมพิทักษ์ ปีการศึกษา 2541
	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ปีการศึกษา 2545

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved