ภาคผนวก ก
วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Yeast extract – Malt extract agar (YM agar)

ประกอบด้วย	- Yeast extract	3.0	กรัม
	- Malt extract	5.0	กรัม
	- Peptone	5.0	กรัม
	- Glucose	10.0	กรัม
	- Agar	20.0	กรัม
	- Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นด้วยน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) agar

ประกอบด้วย	- Yeast extract	10	กรัม/ลิตร
	- Peptone	20	กรัม/ลิตร
	- Glucose	20	กรัม/ลิตร
	- ผงวุ้น	20	กรัม/ลิตร

วิธีเตรียม

ต้มจนผงวุ้นละลายและนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Plate Count Agar

ประกอบด้วย	- Tryptone	5	กรัม/ลิตร
	- Yeast extract	2.5	กรัม/ลิตร
	- Glucose	1	กรัม/ลิตร
	- ผงวุ้น	15	กรัม/ลิตร

Prince of Songkla University Pattani Campus

วิธีเตรียม

ต้มจนผงวุ้นละลายและนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. De Man, Rogosa and Shape (MRS) broth

ประกอบด้วย	- Proteose Peptone	10 กรัม/ลิตร
	- Beef Extract	10 กรัม/ลิตร
	- Yeast Extract	5 กรัม/ลิตร
	- Dextrose	20 กรัม/ลิตร
	- Polysorbate 80	1 กรัม/ลิตร
	- Ammonium Citrate	2 กรัม/ลิตร
	- Sodium Acetate	5 กรัม/ลิตร
	- Magnesium Sulfate	0.1 กรัม/ลิตร
	- Manganese Sulfate	0.05 กรัม/ลิตร
	- Dipotassium Phosphate	2 กรัม/ลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นด้วยน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่ต้องการเตรียมเป็อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ให้เติมผงวุ้นลงไป 15% และต้มจนวุ้นละลาย

5. Solution Starch Agar

ประกอบด้วย	- Solution Starch	4 กรัม/ลิตร
	- Yeast extract	5 กรัม/ลิตร
	- ผงวุ้น	15 กรัม/ลิตร

วิธีเตรียม

ต้มจนผงวุ้นละลายและนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Prince of Songkla University Pattani Campus

6. การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

เจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 จนได้ความเจือจางที่เหมาะสม ปิเปตต์สารละลายที่ระดับความเจือจางที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ทำการหลอมอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) และทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิ 45 - 50 องศาเซลเซียส มาทำโดยใช้เทคนิค pour plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นโดยเลือกนับเฉพาะที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี รายงานผลเป็นจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในรูปโคโลนีต่อกรัม

7. การวิเคราะห์จำนวนยีสต์และรา

เจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 จนได้ความเจือจางที่เหมาะสม ปิเปตต์สารละลายที่ระดับความเจือจางที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ทำการหลอมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) และทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส มาทำโดยใช้เทคนิค pour plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยเลือกนับเฉพาะที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี รายงานผลเป็นจำนวนยีสต์และราในรูปโคโลนีต่อกรัม

8. การวิเคราะห์จำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด

เจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 จนได้ความเจือจางที่เหมาะสม ปิเปตต์สารละลายที่ระดับความเจือจางที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ทำการหลอมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส โดยมาทำด้วยเทคนิค pour plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นโดยเลือกนับเฉพาะที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี รายงานผลเป็นจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก ในรูปโคโลนีต่อกรัม

Prince of Songkla University Pattani Campus

9. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติก

การย้อมสีแกรม (Gram Staining)

วิธีการ

1. นำเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วไปขีดลาก (streak) ลงบนอาหารแข็ง MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่ได้มา smear ลงบน slide ที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้ง นำสไลด์มาลนไฟให้เปลวไฟผ่านสไลด์ตรงรอย smear 2-3 ครั้ง

2. หยดสีคริสตัล ไวโอเลต ให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้นาน 1 นาที จากนั้นเทสีส่วนเกินทิ้งไปล้างน้ำกลั่นเบาๆ ซับด้วยกระดาษทิชชู หรืออาจใช้สารละลายไอโอดีนชะเบาๆ แทนน้ำกลั่นโดยไม่ต้องซับ จนไม่มีสีติดออกมา

3. หยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้ 1 นาทีจากนั้นเทสารละลายไอโอดีนส่วนเกินทิ้งไป

4. ชะด้วนแอลกอฮอล์ 95 % หรือ อะซิโตนแอลกอฮอล์ นาน 15 – 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นทันที ซับด้วยกระดาษทิชชู

5. ย้อมทับด้วยสีซาฟานีน-โอ ให้ท่วม smear ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสีซาฟานิน –โอส่วนเกินทิ้ง ล้างด้วนน้ำกลั่น ซับด้วยกระดาษทิชชู

6. นำไปตรวจดูการติดสีแกรม รปร่าง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 และ 1,000 เท่า

การทดสอบคะตาเลส (Catalase)

วิธีการ

1. นำเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วไปขีดลาก (streak) ลงบนอาหารแข็ง MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่ได้มา smear ลงบน slide ที่สะอาด
2. หยด 3% H202 ลงไปบนเชื้อที่ทำการ smear เอาไว้ แล้วสังเกตฟองแก๊ส ถ้าเกิดฟองแก๊สบันทึกผลเป็น (+) และไม่เกิดฟองแก๊สบันทึกผลเป็นลบ (-)

การอ่านผล

เชื้อที่ให้ผลเป็นลบ และติดสีแกรมบวก (ติดสีน้ำเงิน ม่วง) คือ แบคทีเรียกรดแลกติก

Prince of Songkla University Pattani Campus

ภาคผนวก ข
วิธีการเตรียมสารเคมีและวิธีวิเคราะห์

1. ค่าพีเอช (pH)

โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร มาตรวจสอบค่าความเป็นกรดด่าง ด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์

2. ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Titrateable Acidity;ร้อยละ TTA**)**

วิธีการวิเคราะห์

1. ปิเปตตัวอย่างอาหารมา 5 มิลลิลิตรเติมน้ำกลั่นลงไป 10 มิลลิตร
2. หยดสารละลาย Phenolpthalein จำนวน 2 – 3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ ทำการไตรเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จดปริมาตรด่างที่ใช้ในการไตรเตรท
3. ทำการคำนวณปริมาณของกรดในตัวอย่างอาหาร ในรูปร้อยละของน้ำหนักกรดต่อปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ x น้ำหนักโมเลกุลของกรด หรือกรดแลกติก (90.08)

วิธีการคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของกรด} = \frac{\text{ml (NaOH) x normality (NaOH) x น้ำหนักโมเลกุลของกรด x 100}}{\text{ml ของตัวอย่างที่ใช้ x 1000}}$$

3. Proximate

3.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น วิเคราะห์ตาม AOAC (2000)

วิธีวิเคราะห์

1. Moisture can (แบบมีฝาปิด และก้นภาชนะแบนเรียบเพื่อเพิ่มพื้นที่สัมผัสความร้อน) ในตู้อบลมร้อนซึ่งควบคุมอุณหภูมิคงที่ 105 ºC เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน (ความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม = W)

2. การเตรียมตัวอย่าง

กรณีตัวอย่างเป็นของแข็ง

ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 – 3 กรัม (ความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม = W) ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ใส่ลงใน Moisture can ที่อบไว้แล้วแผ่ตัวอย่างให้กระจายสม่ำเสมอที่ภาชนะ

Prince of Songkla University Pattani Campus

กรณีตัวอย่างเป็นของเหลวหรือกึ่งเหลว

ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 -10 กรัม (ความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม = W2) ใส่ใน Moisture can ที่มีทรายขาว (Sea Sand หรือ Quatz Sand : ประมาณ 2 ช้อนชา) และแท่งแก้วซึ่งอบหาน้ำหนักที่แน่นอนไว้แล้ว (W1) บดตัวอย่างให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันกับทรายขาวด้วยแท่งแก้ว

3. นำตัวอย่างในข้อ 2 ไปใส่ในตู้อบลมร้อนที่ 105 ºC เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ในขณะที่อบให้เปิดฝา moisture can เพื่อให้ตัวอย่างสัมผัสความร้อนโดยตรงและทั่วถึง นอกจากนี้ควรวางตัวอย่างทั้ง 2 ซ้ำ ไว้บนถาดหรือชั้นเดียวกันของตู้อบ

4. หลังอบเสร็จเปิดฝา moisture can นำออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก (ความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม = W3)

การคำนวณ

$$\text{ความชื้น (\%)} = \frac{W2 - W3}{W2 - W1} \times 100$$

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน วิเคราะห์ตาม AOAC (2000)

สารเคมี

1. สารละลายอินดิเคเตอร์ผสม เตรียมโดยละลายบรอมกลีซอลกรีน 0.2 กรัมในแอลกอฮอล์ร้อยละ 75 และละลายเมธิลเรด 0.2 กรัมในแอลกอฮอล์ร้อยละ 75 แล้วนำสารละลาย มาผสมในอัตราส่วน 1:2 โดยปริมาตร

2. สารละลายกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 เตรียมโดยละลายกรดบอริก 40 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3. สารละลายกรดมาตรฐานไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล เตรียมโดยเจือจางไฮโดรคลอริกเข้มข้น 8.2 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปเทียบหาค่ามาตรฐานโดยไทเทรตกับโซเดียมคาร์บอเนต

4. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40

วิธีวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในหลอดย่อย เติมสารคอปเปอร์ซัลเฟตและไดโพแทสเซียมซัลเฟตในอัตราส่วน 1:9 เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นประมาณ 20 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ตั้งหลอดย่อยบนขาตั้ง สวมชุดดูดควันใส่ลงในเครื่องย่อยที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 520 ºC ย่อยเป็นเวลา 45-60 นาที จนได้สารละลายใส ทิ้งให้เย็น นำขวดแก้วรูปชมพู่ซึ่งบรรจุกรดบอริกร้อยละ 4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร หยดสารละลายอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด จนมีสีชมพู นำไปตั้งไว้ที่ตำแหน่งในเครื่องกลั่นและเลื่อนฐานขึ้นให้ปลายแท่งแก้วจุ่มอยู่ใต้สารละลาย ใส่หลอดย่อยในเครื่องกลั่น ปิด

Prince of Songkla University Pattani Campus

หน้าต่างป้องกัน ตั้งเวลาที่ใช้ในการกลั่น เมื่อใช้เสร็จแล้วได้สารละลายประมาณ125-150 มิลลิลิตร โดยสารละลายจะเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเขียว เลื่อนหน้าต่างป้องกันขึ้นถอดหลอดย่อยออก นำสารละลายที่กลั่นได้มาไทเทรตกับสารละลายกรดมาตรฐานไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล จนได้สารละลายสีชมพู (ถึงจุดยุติ)

คำนวณตามสูตร

$$\text{ร้อยละไนโตรเจน} = \frac{(A-B) \times 14 \times N \times 100}{1{,}000 \times W}$$

$$\text{ร้อยละโปรตีน} = \text{ร้อยละไนโตรเจน} \times 6.25$$

โดย A คือ ปริมาณกรดที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B คือ ปริมาณกรดที่ใช้ในการไทเทรตกับ blank (มิลลิลิตร)

N คือ ความเข้มข้นกรดที่ใช้ในการไทเทรต (นอร์มัล)

W คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน โดยใช้ Soxlet method

เตรียมตัวอย่างโดยบดให้ละเอียดด้วยเครื่องตีป่นนาน 2 นาที นำไปใส่ในถาดอะลูมิเนียมฟอยด์ อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 ºC เป็นเวลา 12 ชั่วโมง บดให้ละเอียดด้วยโกร่ง จากนั้นชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 3 กรัม บนกระดาษกรอง (Whatman No.1) และห่อให้มิดชิด จากนั้นนำมาใส่ลงในทิมเบิล (thimbles 26x60 mm.) แล้วนำทิมเบิลไปใส่ใน soxtec system HT โดยใช้ adepter สวม เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ (petrolemether) ลงในถ้วยอะลูมิเนียม (extraction cups) ที่นำไปอบและชั่งน้ำหนักแล้วประมาณ 50-75 มิลลิลิตร นำเข้าไปใน soxtec system HT พร้อมทั้งโยกคันโยกลง เลื่อนคันโยกไปที่ตำแหน่ง boiling และสกัดเป็นเวลา 15-20 นาที จากนั้นเลื่อนคันโยกมาที่ตำแหน่ง rinsing ทำการกลั้ว เป็นเวลา 30-45 นาที จากนั้นระเหยปิโตรเลียมอีเทอร์พร้อมกับปิด condensors valve และเปิดสวิทซ์ของอากาศ แล้วนำถ้วยอะลูมิเนียมไปอบที่อุณหภูมิ 100 ºC เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถอบแห้ง ชั่งน้ำหนัก

คำนวณตามสูตร

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{w2-w1 \times 100}{w}$$

โดย w คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

w1 คือ น้ำหนักถ้วยอะลูมิเนียม(กรัม)

w2 คือ น้ำหนักถ้วยอะลูมิเนียมและไขมันที่สกัดได้จากตัวอย่าง (กรัม)

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.4 ปริมาณเถ้า (Ash)

วิธีวิเคราะห์

1. เผา crucible ใน muffle furnace ที่อุณหภูมิ 550 ºC เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
2. ทิ้งให้ crucible เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักแห้งทันทีที่เย็นลงถึงอุณหภูมิห้อง (W1)
3. ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน ประมาณ 2 – 5 กรัม ใส่ใน crucible (W2)
4. กรณีตัวอย่างเป็นของเหลวนำตัวอย่างไประเหยน้ำบนอ่างน้ำร้อน (ในกรณีที่เป็นตัวอย่างแห้งทำให้ตัวอย่างเปียกน้ำก่อนนำไประเหย ค่อย ๆ ฉีดน้ำกลั่นลงบนตัวอย่างและใช้แท่งแก้วคนให้ตัวอย่างกระจายสม่ำเสมอทั่วภาชนะ จากนั้นให้เผาตัวอย่างบนhot plate ในตู้ดูดควัน (fume hood) โดยค่อย ๆเพิ่มอุณหภูมิจนกระทั่งเป็นเถ้าดำ หรือหมดควันขาว
5. นำ crucible เข้า muffle furnace ที่อุณหภูมิ 550 ºC จนกระทั่งได้เถ้าสีขาวหรือเทา หรือจนน้ำหนักคงที่ (โดยปกติจะใช้เวลา 3 ชั่วโมง)
6. หลังเผาตัวอย่างใน muffle furnace แล้วถ้ายังมีก้อนสีดำปนอยู่ แสดงว่ายังมีส่วนของคาร์บอน หรือสารอนินทรีย์หลงเหลืออยู่ ให้ฉีดน้ำกลั่นลงไปทำให้เถ้าเปียกแล้วใช้แท่งแก้วบดให้กระจายสม่ำเสมอไม่จับเป็นก้อน จากนั้นระเหยแห้งบนอ่างควบคุมอุณหภูมิ ก่อนนำไปเผาต่อในmuffle furnace ทิ้งตัวอย่างให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักทันทีที่เย็นลง (W3)

การคำนวณ

$$\text{เถ้า (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้า}}{\text{W2 – W1}} \times 100$$

$$= \frac{\text{W3 – W1}}{\text{W2 – W1}} \times 100$$

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.5 ปริมาณใยอาหาร (Fiber)

วิธีวิเคราะห์

1. บันทึกลักษณะตัวอย่างอาหาร
2. เตรียมตัวอย่างอาหาร
3. การสกัดไขมันออกจากตัวอย่าง
4. นำตัวอย่างอาหาร ที่ไม่มีไขมันไปต้มในสารละลายกรดกำมะถันเข้มข้น 0.1275 โมลาร์ จำนวน 200 มิลลิลิตร นาน 30 นาที เพื่อสลายคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน เขย่าขวดตลอดเวลา
5. กรองสารละลายผ่านเครื่องกรองแบบบุชเนอร์ ล้างกากด้วยน้ำร้อนหลาย ๆครั้ง จนกระทั่งไม่มีกรดเหลืออยู่ในกาก
6. เทกากกลับไปในฟลาสต์ใบเดิม ใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.313 นอร์มอล จำนวน 200 มิลลิลิตร ล้างกากออกจากกระดาษกรอง นำไปต้มเดือดนาน 30 นาที
7. กรองสารละลายอีกครั้ง แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนจนไม่มีด่างเหลืออยู่
8. เทกากกลับไปในฟลาสต์ใบเดิม ล้างกากด้วยสารละลายกรดเกลือเข้มข้นร้อยละ 1 แล้วเทน้ำร้อนล้างจนไม่มีกากเหลืออยู่
9. ล้างกากด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 2 ครั้ง และไดเอทธิลอีเทอร์ 3 ครั้ง นำกากที่เหลือใส่ลงบนกระดาษกรองปราศจากเถ้า หรือถ้วยกระเบื้องที่ผ่านการอบที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ล้างส่วนที่ติดกระดาษกรองด้วยน้ำร้อนเล็กน้อย
10. นำไประเหยให้แห้งบนอ่างควบคุมอุณหภูมิ 100 ºC จนน้ำหนักคงที่ ชั่งหาน้ำหนักของกากที่เหลือ
11. นำกากไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 500 – 550 ºC นาน 3 ชั่วโมงเหลือจนกระทั่งได้เถ้าสีขาว ปล่อยทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งหาเถ้าที่ได้

คำนวณปริมาณใยอาหาร

ปริมาณเส้นใยในตัวอย่างอาหาร = น้ำหนักแห้ง - น้ำหนักเถ้า

3.6 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (Total carbohydrate)

การคำนวณ

ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด(ร้อยละของน้ำหนัก)

= 100 – (% ความชื้น - %เถ้า - %ไขมัน - %โปรตีน)

Prince of Songkla University Pattani Campus

4. การวัดปริมาตรการขึ้นฟู (rapeseed displacement)

1. ชั่งน้ำหนักของขนมถ้วยฟู แล้วใส่ลงในภาชนะที่มีความสูงและกว้างกว่าตัวอย่าง

2. เติมเมล็ดงาให้เต็มช่องว่าง ทั้งด้านข้างและด้านบน ปาดให้เปรียบ แล้ววัดปริมาตรเมล็ดงาที่ใช้เติมลงไปทั้งหมด

3. วัดปริมาตรของภาชนะโดยเติมเมล็ดงาให้เต็มภาชนะ ปาดให้เรียบ แล้ววัดปริมาตรเมล็ดงาทั้งหมด

การคำนวณ

ปริมาตรการขึ้นฟู (ลูกบาศก์เซนติเมตร /กรัม)

$$= \frac{\text{ปริมาตรเมล็ดงาของภาชนะ (3.) – ปริมาตรเมล็ดงาที่มีขนมอยู่ (2.)}}{\text{น้ำหนักขนม (1.)}}$$

5. อัตราการเจริญสูงสุด

1. เตรียมสารละลายเซลล์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

2. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเซลล์ในชั่วโมงที่ 0

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเซลล์ในชั่วโมงต่าง ๆ

การคำนวณ

อัตราการเจริญสูงสุด

$$= \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแต่ละชั่วโมง – ค่าการดูดกลืนแสงในชั่วโมงที่ 0}}{\text{ชั่วโมง}}$$

5. สารละลาย

5.1 สารละลาย NaOH มาตรฐาน

เตรียมโดยชั่ง NaOH 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นซึ่งต้มจนเดือดและทำให้เย็นแล้ว 1,000 มิลลิลิตร

การทำ standardization เพื่อหาความเข้มข้นที่แน่นอนของ NaOH

เตรียม standard potassium hydrogen phathalate (KHP) โดยการอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน นำออกมาทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น จากนั้นนำมาชั่งใส่ flask 250 มิลลิลิตร จำนวน 3 ใบ ๆ ละ 0.1 กรัม บันทึกน้ำหนักไว้ เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เขย่าจน KHP ละลายหมด หยด phenolphthalein 3 หยด ทำการไตเตรท (titrate) ด้วย 0.1 N NaOH ที่เตรียมไว้ บันทึกปริมาตรที่ใช้ นำไปคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของ NaOH ตามสูตร ดังต่อไปนี้

$$\text{ความเข้มข้นของ NaOH} = \frac{\text{น้ำหนักของ KHP} \times 1000}{\text{(N) ml ของ NaOH} \times 204.229}$$

Prince of Songkla University Pattani Campus

5.2 สารละลาย phenolphthalein

เตรียมโดยชั่ง Phenolphthalein 0.5-1 กรัม ละลายในสารละลาย เอธานอล-น้ำ 100 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย เอธานอล 60 มิลลิลิตร และน้ำ 40 มิลลิลิตร

5.3 Lugals′iodine

เตรียมโดยชั่ง iodine 1 กรัม และ potassium iodide 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา

Prince of Songkla University
Pattani Campus

ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวกที่ 1 การเปลี่ยนแปลงปริมาตรการขึ้นฟูของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากจากกล้าเชื้ออำเภอโคกโพธิ์ (01) อำเภอยะหริ่ง (02) และอำเภอสายบุรี (03) ที่ระดับอุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ระยะ เวลาการหมัก (ชั่วโมง)	ขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมาก อำเภอโคกโพธิ์(01)				ขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมาก อำเภอยะหริ่ง (02)				ขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมาก อำเภอสายบุรี (03)			
	น้ำหนักขนม (g)	ปริมาตรเมล็ดงาของภาชนะ (ml)	ปริมาตรเมล็ดงาที่มีขนมอยู่ (ml)	ปริมาตรการขึ้นฟู (Cm^3/g)	น้ำหนักขนม (g)	ปริมาตรเมล็ดงาของภาชนะ (ml)	ปริมาตรเมล็ดงาที่มีขนมอยู่ (ml)	ปริมาตรการขึ้นฟู (Cm^3/g)	น้ำหนักขนม (g)	ปริมาตรเมล็ดงาของภาชนะ (ml)	ปริมาตรเมล็ดงาที่มีขนมอยู่ (ml)	ปริมาตรการขึ้นฟู (Cm^3/g)
1	8.48	175	169	**0.71** [b]	8.19	175	169	**0.73** [b]	8.25	175	170	**0.61** [b]
2	8.88	175	169	**0.68** [b]	8.68	175	169	**0.70** [b]	8.64	175	170	**0.58** [b]
3	8.68	175	169	**0.70** [b]	8.92	175	168	**0.78** [b]	9.02	175	169	**0.67** [b]
4	8.48	175	169	**0.71** [b]	8.78	175	168	**0.80** [b]	8.63	175	169	**0.70** [b]
5	8.61	175	167	**0.92** [a]	8.35	175	166	**1.07** [a]	8.35	175	168	**0.83** [a]
6	8.39	175	168	**0.83** [a]	8.28	175	167	**0.97** [a]	8.36	175	168	**0.84** [a]

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางภาคผนวกที่ 2 การเปลี่ยนแปลงปริมาตรการขึ้นฟูของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากจากกล้าเชื้ออำเภอโคกโพธิ์ (01) อำเภอยะหริ่ง (02) และอำเภอสายบุรี (03) ที่ระดับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ระยะ เวลาการหมัก (ชั่วโมง)	ขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมาก อำเภอโคกโพธิ์(01)				ขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมาก อำเภอยะหริ่ง (02)				ขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมาก อำเภอสายบุรี (03)			
	น้ำหนักขนม (g)	ปริมาตรเมล็ดงาของภาชนะ (ml)	ปริมาตรเมล็ดงาที่มีขนมอยู่ (ml)	ปริมาตรการขึ้นฟู (Cm^3/g)	น้ำหนักขนม (g)	ปริมาตรเมล็ดงาของภาชนะ (ml)	ปริมาตรเมล็ดงาที่มีขนมอยู่ (ml)	ปริมาตรการขึ้นฟู (Cm^3/g)	น้ำหนักขนม (g)	ปริมาตรเมล็ดงาของภาชนะ (ml)	ปริมาตรเมล็ดงาที่มีขนมอยู่ (ml)	ปริมาตรการขึ้นฟู (Cm^3/g)
1	8.52	176	172	**0.47** ^{c}	8.52	176	169	**0.82** ^{c}	8.7	176	171	**0.57** ^{c}
2	8.98	176	171	**0.56** ^{c}	8.86	176	168	**0.90** ^{c}	8.75	176	170	**0.68** ^{c}
3	8.76	176	169	**0.80** ^{c}	8.67	176	167	**1.04** ^{b}	8.37	176	170	**0.72** ^{c}
4	8.58	176	167	**1.04** ^{b}	8.89	176	163	**1.46** ^{b}	8.29	176	167	**1.08** ^{b}
5	8.74	176	167	**1.03** ^{b}	8.89	176	159	**1.91** ^{a}	8.03	176	168	**0.99** ^{b}
6	8.65	176	168	**0.92** ^{b}	8.09	176	161	**1.85** ^{a}	8.29	176	169	**0.84** ^{b}

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางภาคผนวกที่ 3 การเปลี่ยนแปลงปริมาตรการขึ้นฟูของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากจากะกล้าเชื้อบริสุทธิ์ ที่ระดับอุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส และที่ระดับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ระยะ เวลาการหมัก (ชั่วโมง)	ขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส				ขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส			
	น้ำหนักขนม (g)	ปริมาตรเมล็ดงาของภาชนะ (ml)	ปริมาตรเมล็ดงาที่มีขนมอยู่ (ml)	ปริมาตรการขึ้นฟู (Cm^3/g)	น้ำหนักขนม (g)	ปริมาตร เมล็ดงาของภาชนะ (ml)	ปริมาตรเมล็ดงาที่มีขนมอยู่ (ml)	ปริมาตร การขึ้นฟู (Cm^3/g)
2	8.45	176	168	**0.95** [a]	8.96	176	166	**1.11** [a]
3	8.54	176	164	**1.40** [a]	8.96	176	163	**1.45** [a]
4	8.82	176	163	**1.47** [a]	8.83	176	163	**1.47** [a]
5	8.86	176	163	**1.47** [a]	8.77	176	163	**1.48** [a]

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางภาคผนวกที่ 4 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ค่าความเป็นกรดและค่า pH ของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอโคกโพธิ์ ที่ระดับอุณหภูมิ30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

จุลินทรีย์ ชนิดต่าง ๆ	**ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)**						
	0	1	2	3	4	5	6
จุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/ml)	2.97×10^{6}	1.07×10^{8}	2.03×10^{8}	7.30×10^{7}	4.45×10^{7}	1.32×10^{8}	8.00×10^{7}
ยีสต์และรา (CFU/ml)	1.28×10^{6}	2.34×10^{7}	4.40×10^{7}	5.00×10^{6}	2.85×10^{7}	2.70×10^{7}	2.85×10^{7}
ยีสต์ (CFU/ml)	4.50×10^{7}	3.40×10^{7}	5.30×10^{7}	3.50×10^{7}	4.00×10^{7}	7.00×10^{7}	5.00×10^{7}
แบคทีเรียกรดแลกติก (CFU/ml)	1.11×10^{7}	9.35×10^{7}	1.06×10^{8}	2.62×10^{7}	4.05×10^{7}	1.10×10^{8}	6.00×10^{7}
pH	6.52	5.73	4.53	4.53	4.56	4.53	4.52
TTA (ร้อยละ)	0.50	0.57	0.58	0.67	0.62	0.94	0.69

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางภาคผนวกที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ค่าความเป็นกรดและค่า pH ของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอยะหริ่ง ที่ระดับอุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

จุลินทรีย์ ชนิดต่าง ๆ	**ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)**						
	0	1	2	3	4	5	6
จุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/ml)	1.18×10^{8}	1.65×10^{8}	2.17×10^{8}	7.25×10^{7}	2.50×10^{7}	8.70×10^{7}	6.65×10^{7}
ยีสต์และรา (CFU/ml)	2.43×10^{6}	7.25×10^{7}	6.10×10^{7}	8.00×10^{6}	1.15×10^{7}	8.45×10^{7}	3.30×10^{7}
ยีสต์ (CFU/ml))	2.24×10^{8}	7.50×10^{7}	9.40×10^{7}	3.40×10^{7}	2.00×10^{7}	7.50×10^{7}	2.50×10^{7}
แบคทีเรียกรดแลกติก (CFU/ml)	1.05×10^{8}	2.00×10^{8}	1.29×10^{8}	6.40×10^{7}	3.00×10^{7}	1.05×10^{8}	6.20×10^{7}
pH	6.54	5.77	4.54	4.51	4.55	4.5	4.48
TTA (ร้อยละ)	0.48	0.54	0.60	0.63	0.74	0.85	0.71

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางภาคผนวกที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ค่าความเป็นกรดและค่า pH ของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอสายบุรี ที่ระดับอุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

จุลินทรีย์ ชนิดต่าง ๆ	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)						
	0	1	2	3	4	5	6
จุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/ml)	1.25×10^8	1.84×10^8	9.80×10^7	1.26×10^8	3.10×10^7	1.35×10^8	2.00×10^8
ยีสต์และรา (CFU/ml)	4.95×10^5	2.65×10^7	9.50×10^7	2.80×10^6	1.12×10^7	1.86×10^7	6.50×10^6
ยีสต์ (CFU/ml)	2.09×10^8	5.70×10^7	7.60×10^7	6.30×10^7	6.10×10^7	6.50×10^7	6.10×10^7
แบคทีเรียกรดแลกติก (CFU/ml)	1.03×10^8	1.64×10^8	1.26×10^8	9.30×10^7	1.40×10^7	1.26×10^8	4.00×10^7
pH	6.62	5.86	4.55	4.55	4.56	4.54	4.54
TTA (ร้อยละ)	0.50	0.60	0.67	0.70	0.70	0.73	0.67

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางภาคผนวกที่ 7 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ค่าความเป็นกรดและค่า pH ของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอโคกโพธิ์ ที่ระดับอุณหภูมิ35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

จุลินทรีย์ ชนิดต่าง ๆ	**ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)**						
	0	1	2	3	4	5	6
จุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/ml)	2.97×10^{6}	2.02×10^{8}	1.39×10^{8}	1.38×10^{8}	1.68×10^{8}	2.94×10^{8}	2.63×10^{8}
ยีสต์และรา (CFU/ml)	1.28×10^{6}	1.29×10^{7}	7.95×10^{6}	5.30×10^{6}	3.20×10^{6}	1.57×10^{7}	1.33×10^{7}
ยีสต์ (CFU/ml)	4.50×10^{7}	2.90×10^{7}	7.25×10^{7}	8.00×10^{6}	3.00×10^{6}	1.85×10^{7}	1.34×10^{7}
แบคทีเรียกรดแลกติก (CFU/ml)	1.11×10^{7}	1.17×10^{8}	1.18×10^{8}	1.51×10^{8}	1.79×10^{8}	2.60×10^{8}	1.78×10^{8}
pH	6.57	4.67	4.55	4.55	4.5	4.47	4.44
TTA (ร้อยละ)	0.50	0.66	0.63	0.53	0.62	0.61	0.66

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางภาคผนวกที่ 8 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ค่าความเป็นกรดและค่า pH ของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอยะหริ่ง ที่ระดับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

จุลินทรีย์ ชนิดต่าง ๆ	**ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)**						
	0	1	2	3	4	5	6
จุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/ml)	1.18×10^{8}	1.86×10^{8}	1.35×10^{8}	1.61×10^{8}	9.35×10^{7}	1.57×10^{8}	2.93×10^{8}
ยีสต์และรา (CFU/ml)	2.43×10^{6}	1.79×10^{7}	8.55×10^{6}	1.61×10^{7}	9.00×10^{6}	1.06×10^{7}	4.90×10^{6}
ยีสต์ (CFU/ml)	2.24×10^{8}	3.15×10^{7}	6.10×10^{6}	1.40×10^{7}	4.00×10^{6}	2.45×10^{7}	5.65×10^{7}
แบคทีเรียกรดแลกติก (CFU/ml)	1.05×10^{8}	1.45×10^{8}	1.22×10^{8}	1.63×10^{8}	1.09×10^{8}	$1.93E \times 10^{8}$	2.83×10^{8}
pH	6.50	4.62	4.58	4.58	4.56	4.51	4.47
TTA (ร้อยละ)	0.49	0.46	0.58	0.56	0.59	0.643	0.72

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางภาคผนวกที่ 9 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ค่าความเป็นกรดและค่า pH ของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอสายบุรี ที่ระดับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

จุลินทรีย์ ชนิดต่าง ๆ	**ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)**						
	0	1	2	3	4	5	6
จุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/ml)	1.25×10^{8}	1.80×10^{8}	1.23×10^{8}	1.23×10^{8}	1.16×10^{8}	1.72×10^{8}	2.84×10^{7}
ยีสต์และรา (CFU/ml)	4.95×10^{5}	1.46×10^{7}	8.00×10^{6}	4.35×10^{7}	2.60×10^{6}	1.12×10^{7}	5.30×10^{7}
ยีสต์ (CFU/ml)	2.09×10^{8}	3.20×10^{7}	6.35×10^{6}	2.30×10^{7}	6.00×10^{5}	1.44×10^{7}	6.55×10^{6}
แบคทีเรียกรดแลกติก (CFU/ml)	1.03×10^{8}	1.40×10^{8}	1.31×10^{8}	1.51×10^{8}	1.31×10^{8}	1.55×10^{8}	2.74×10^{8}
pH	6.57	4.59	4.6	4.65	4.51	4.44	4.43
TTA (ร้อยละ)	0.50	0.54	0.64	0.46	0.62	0.57	0.66

Prince of Songkla University Pattani Campus

แบบสอบถามความชอบของผู้บริโภค ขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน

ชื่อ .... วันที่ .....

ตัวอย่าง : ขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน

คำแนะนำ : กรุณาตอบแบบสอบถามดังต่อไปนี้ โดยให้คะแนน

1 = ไม่ชอบมากที่สุด
2 = ไม่ชอบมาก
3 = ไม่ชอบปานกลาง
4 = ไม่ชอบเล็กน้อย
5 = เฉย ๆ
6 = ชอบเล็กน้อย
7 = ชอบปานกลาง
8 = ชอบมาก
9 = ชอบมากที่สุด

คุณลักษณะ	คะแนนความชอบ		
รหัส	_____	_____	_____
สี	_____	_____	_____
กลิ่น	_____	_____	_____
ลักษณะเนื้อสัมผัส	_____	_____	_____
รสชาติ	_____	_____	_____
ความชอบโดยรวม	_____	_____	_____

ข้อเสนอแนะ .....
.....

ขอบคุณค่ะ...

Prince of Songkla University Pattani Campus