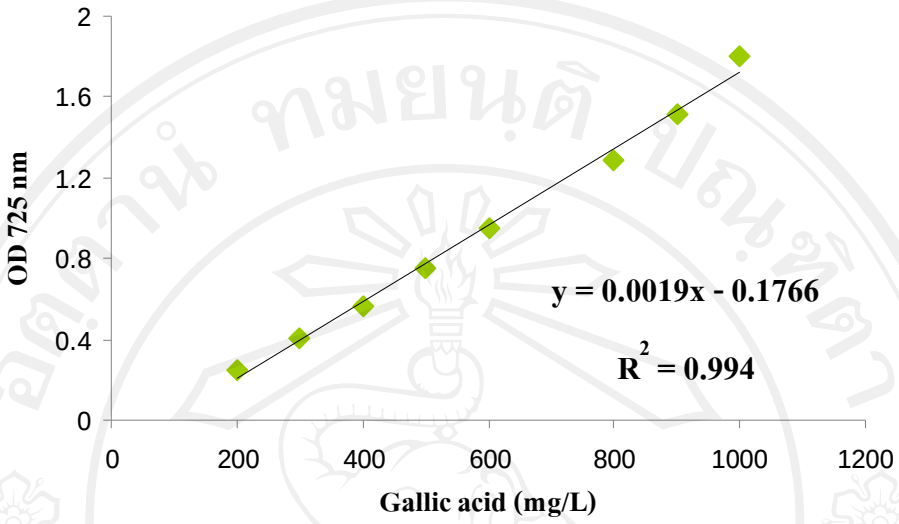
ภาคผนวก ก

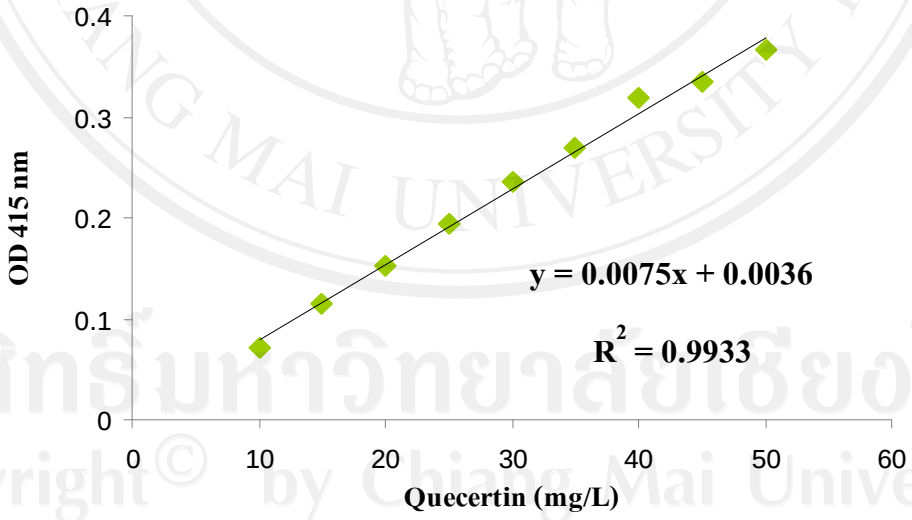
การวิเคราะห์คุณภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ปริมาณสารแอนติออกซิแดนซ์และความสามารถในการต้านออกซิเดชัน



ภาพ ก.1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) วิเคราะห์โดยวิธีการหาปริมาณฟีโนลิกทั้งหมด



ภาพ ก.2 กราฟมาตรฐานควอเซอติน (Quercetin) วิเคราะห์โดยวิธีการหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (Ranganna, 1977)

ขั้นตอนที่ 1 หา ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ทั้งหมดต่อตัวอย่าง 100 กรัม หรือ 100 มิลลิลิตร จากสูตร

$$A = \frac{B \times C \times D \times 100}{E \times F}$$

เมื่อ A = ค่า OD ทั้งหมดต่อตัวอย่าง 100 กรัมหรือมิลลิลิตร

B = ค่า OD ของตัวอย่างที่ 535 นาโนเมตร

C = ปริมาตรของตัวอย่างจากการสกัดที่ปรับปริมาตรเพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง (มิลลิลิตร)

D = ปริมาตรของสารสกัดทั้งหมดที่ได้ (มิลลิลิตร)

E = ค่าปริมาตรตัวอย่างที่ใช้วัดค่าการดูดกลืนแสง (มิลลิลิตร)

F = ปริมาณตัวอย่างที่ใช้เริ่มต้นในการสกัด (กรัมหรือมิลลิลิตร)

ขั้นตอนที่ 2 หาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด

ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง100กรัมหรือมิลลิลิตร) = $\frac{A}{98.2}$

ตัวอย่างการคำนวณ เช่น ผลหม่อน 100 กรัม ผ่านกรรมวิธีการสกัดกับสารละลายผสม เอทาโนลิก –ไฮโดรคลอลิก กรอง และปรับปริมาตร ได้ 500 มิลลิลิตร (D) จากนั้นนำสารสกัดมา 2 มิลลิลิตร (E) เจือจาง และปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสมเอทาโนลิก – ไฮโดรคลอลิก จนได้ปริมาตรทั้งหมด 100 มิลลิลิตร (B) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตร ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.4

$$A = \frac{0.4 \times 100 \times 500 \times 100}{2 \times 100}$$

ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง100กรัมหรือมิลลิลิตร) = $\frac{10{,}000}{98.2}$ = 101.7

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการคำนวณค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH (EC_{50}) (Manthey, 2004)

1. การหาปริมาณ % DPPH radical scavenging activity จากสูตร

$$\% \text{ radical scavenging activity} = [A_0 - (A_1 - A_S)] / A_0 \times 100$$

เมื่อ A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH และตัวทำละลายที่ใช้ (Blank)

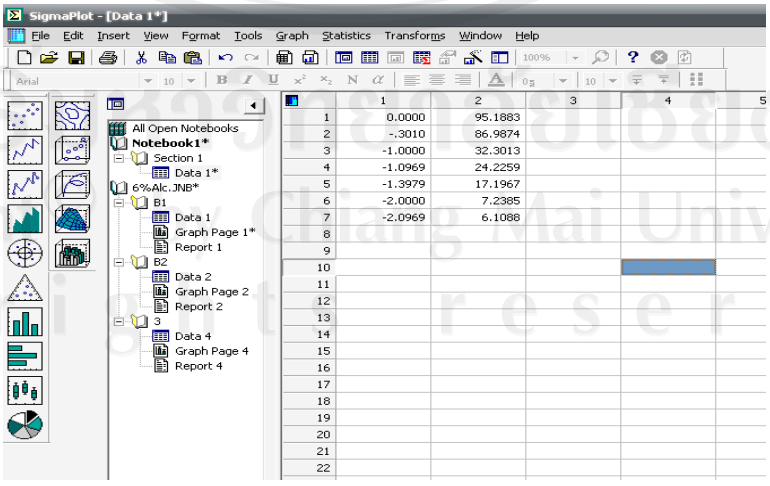
A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH และตัวอย่าง

A_S = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่เติมตัวทำละลายที่ใช้ แทนการเติมDPPH

ทำการหา % DPPH radical scavenging activity ในทุกความเข้มข้นของตัวอย่างที่ได้ทำการเจือจาง เพื่อนำไปใช้คำนวณในขั้นตอนที่ 2 ต่อไป

2. การหาค่า EC_{50}

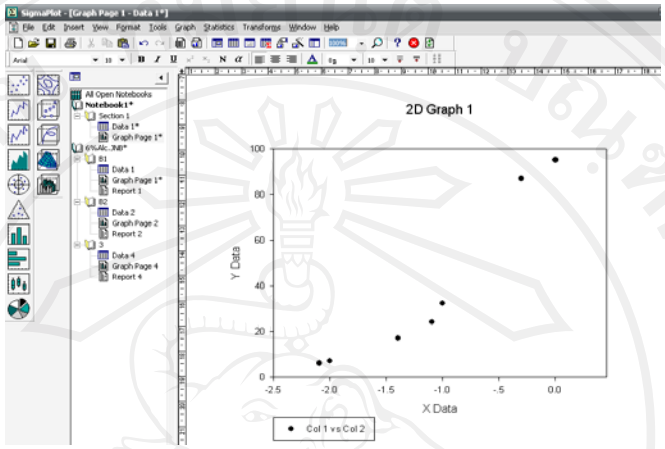
1. ทำการพลอตกราฟระหว่าง ค่า log ของความเข้มข้นของตัวอย่าง กับค่า % radical scavenging activity ในโปรแกรม SigmaPlot 10.0 trial version (Systat Software Inc., Germany) โดยเติมค่าลงในช่อง ตารางของโปรแกรมในหน้า Data ดังภาพ ก.3 โดยค่า log ของความเข้มข้นของตัวอย่างอยู่ใน คอลัมน์ที่ 1และ ค่า % radical scavenging activity อยู่ในคอลัมน์ที่ 2



ภาพ ก.3 การเติม ค่า log ของความเข้มข้นของตัวอย่างกับค่า % radical scavenging activity ในโปรแกรม SigmaPlot 10.0 trial version

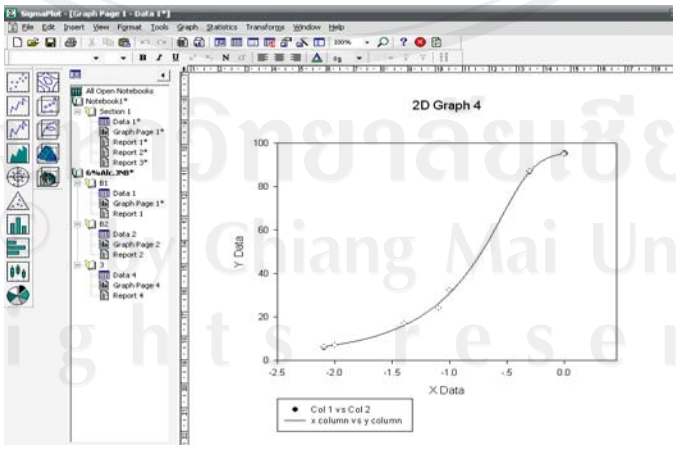
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ไปที่เมนูตามลำดับดังนี้ Graph > Creat graph > Scatter plot > Simple scatter > XY pair เลือก Data for X เป็น Column 1 และเลือก Data for Y เป็น Column 2 จากนั้นไปที่ Finish จะได้กราฟใน หน้า Graph ดังภาพ ก.4



ภาพ ก.4 กราฟค่า log ของความเข้มข้นของตัวอย่างกับค่า % radical scavenging activity ในโปรแกรม SigmaPlot 10.0 trial version

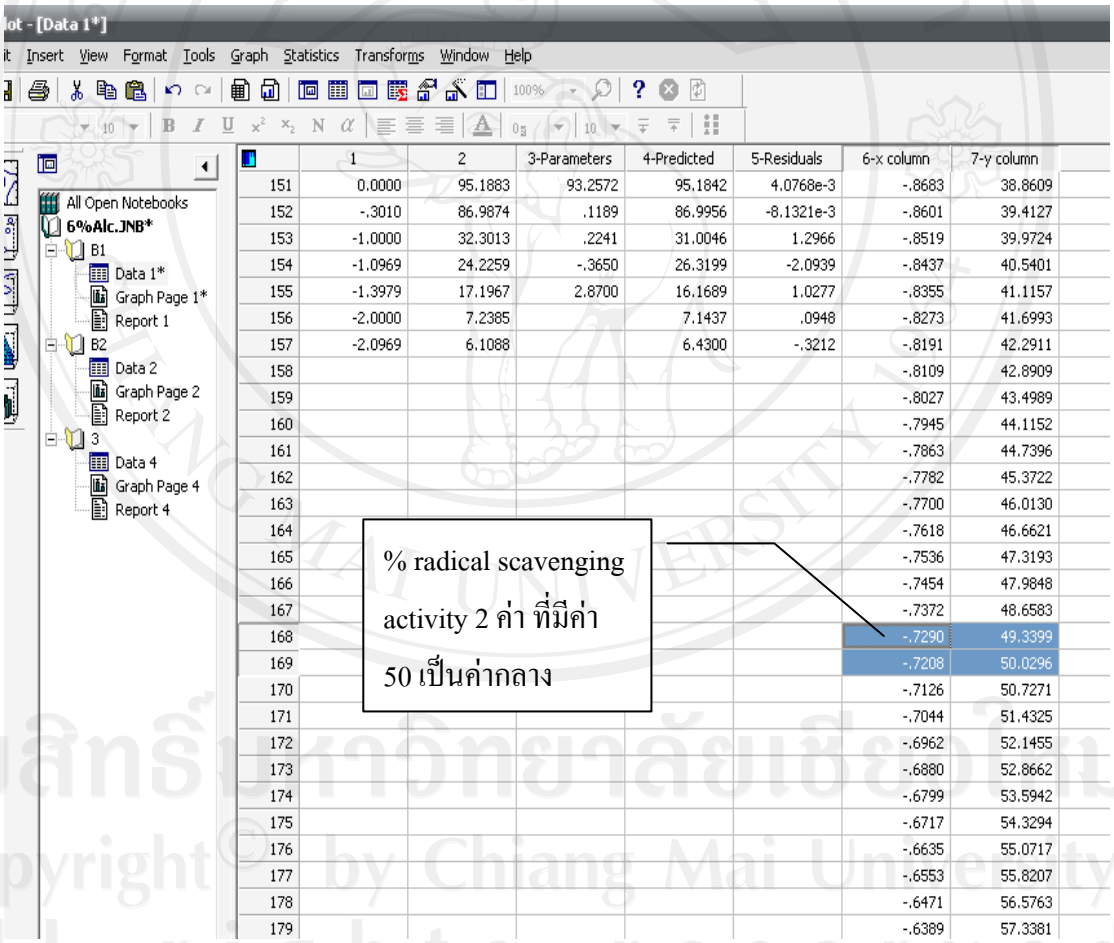
3. คลิกเมาส์ด้านขวาที่จุดที่พลอตในกราฟที่ได้ จะปรากฏเมนูขึ้นมา ให้เลือก Fit curve เลือกช่อง Equation category เป็น Sigmoidal โดย เลือก Sigmoid parameter ที่ให้ค่า R^2 มากที่สุด จากนั้นไปที่ Finish จะได้กราฟที่มีเส้นแนวโน้มขึ้นมา ดังภาพ ก.5



ภาพ ก.5 กราฟค่า log ของความเข้มข้นของตัวอย่างกับค่า % radical scavenging activity ที่มีเส้นแนวโน้ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. จากนั้นกลับไปที่หน้า Data โดยเลือก Data ที่อยู่ทางด้านซ้ายมือ (ภาพ ก.6) จะพบว่ามีคอลัมน์เพิ่มขึ้น โดยค่าในคอลัมน์ที่ 6 จะเป็นค่า log ของความเข้มข้นของตัวอย่างอย่างละเอียดจากกราฟที่พลอต และ คอลัมน์ที่ 7 เป็นค่า % radical scavenging activity อย่างละเอียดจากกราฟที่พลอต โดยให้เลือก ค่า log ของความเข้มข้นของตัวอย่างที่ค่า % radical scavenging activity อยู่ในช่วงที่มีค่า 50 เป็นค่ากลางมา 2 ค่า นำไปเทียบคำนวณโดยการทำ Interpolate เพื่อหาว่าที่ค่า % radical scavenging activity เท่ากับ 50 นั้น จะมีค่า log ของความเข้มข้นของตัวอย่างเท่ากับเท่าไหร่ หลังจากได้ค่าแล้วก็ทำการถอด log ซึ่ง จะทำให้ได้ค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถลด ปริมาณสารแอนติออกซิแดนซ์ลงได้ร้อยละ 50 หรือค่า EC_{50}



	1	2	3-Parameters	4-Predicted	5-Residuals	6-x column	7-y column
151	0.0000	95.1883	93.2572	95.1842	4.0768e-3	-.8683	38.8609
152	-.3010	86.9874	.1189	86.9956	-8.1321e-3	-.8601	39.4127
153	-1.0000	32.3013	.2241	31.0046	1.2966	-.8519	39.9724
154	-1.0969	24.2259	-.3650	26.3199	-2.0939	-.8437	40.5401
155	-1.3979	17.1967	2.8700	16.1689	1.0277	-.8355	41.1157
156	-2.0000	7.2385		7.1437	.0948	-.8273	41.6993
157	-2.0969	6.1088		6.4300	-.3212	-.8191	42.2911
158						-.8109	42.8909
159						-.8027	43.4989
160						-.7945	44.1152
161						-.7863	44.7396
162						-.7782	45.3722
163						-.7700	46.0130
164						-.7618	46.6621
165						-.7536	47.3193
166						-.7454	47.9848
167						-.7372	48.6583
168						-.7290	49.3399
169						-.7208	50.0296
170						-.7126	50.7271
171						-.7044	51.4325
172						-.6962	52.1455
173						-.6880	52.8662
174						-.6799	53.5942
175						-.6717	54.3294
176						-.6635	55.0717
177						-.6553	55.8207
178						-.6471	56.5763
179						-.6389	57.3381

ภาพ ก.6 Data ที่มีจำนวนคอลัมน์เพิ่มหลังการพลอตกราฟ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและกายภาพ

การวัดค่าสีระบบฮันเตอร์

เป็นการวัดค่าสีในรูป ค่าสี L* a* และ b* ในงานวิจัยนี้วัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสี Chroma meter model CR-400 (KONICA MINOLTA, Japan) โดยค่า L* คือ ค่าความสว่าง (lightness) มีค่าตั้งแต่ 0 (สีดำ) จนถึง 100 (สีขาว) ถ้ามีค่าสูงแสดงว่าผลิตภัณฑ์นั้นมีสีสว่างมาก ถ้ามีค่าต่ำแสดงว่าผลิตภัณฑ์นั้นมีสีคล้ำหรือค่อนข้างมืด ค่า a* ถ้ามีค่าเป็นบวก แสดงว่าผลิตภัณฑ์นั้นมีแนวโน้มไปทางสีแดง (redness) ถ้ามีค่าเป็นลบ แสดงว่าผลิตภัณฑ์นั้นมีแนวโน้มไปทางสีเขียว (greenness) ส่วนค่า b* คือ มีค่าเป็นบวก แสดงว่าผลิตภัณฑ์นั้นมีแนวโน้มไปทางสีเหลือง (yellowness) ถ้าเป็นค่าลบแสดงว่าผลิตภัณฑ์มีแนวโน้มเป็นสีน้ำเงิน (blueness) (วิษฐิดา, 2550)

การหาปริมาณกรดทั้งหมด (Total titratable acidity) (AOAC, 1998)

ชั่งตัวอย่างอาหารหนัก 10 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย คนให้ละลายเข้ากันดี ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร โดยใช้ Volumetric flask กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ปิเปตของเหลวที่กรองได้มา 10 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปไตเตรทกับ 0.01 N NaOH ที่ผ่านการ standardize แล้ว โดยใช้ฟีนอฟธาลีน 2-3 หยดเป็นอินดิเคเตอร์ คำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดที่มีอยู่ในปริมาณมากของตัวอย่างอาหารนั้น โดยสารละลาย 0.1N NaOH จำนวน 1 มิลลิลิตรทำปฏิกิริยาสมมูลย์พอดีกับกรดอะซิติก (CH_3COOH) 6.005 มิลลิกรัม และทำปฏิกิริยาสมมูลย์พอดีกับกรดซิตริก ($C_6H_8O_7.H_2O$) 7.005 มิลลิกรัม

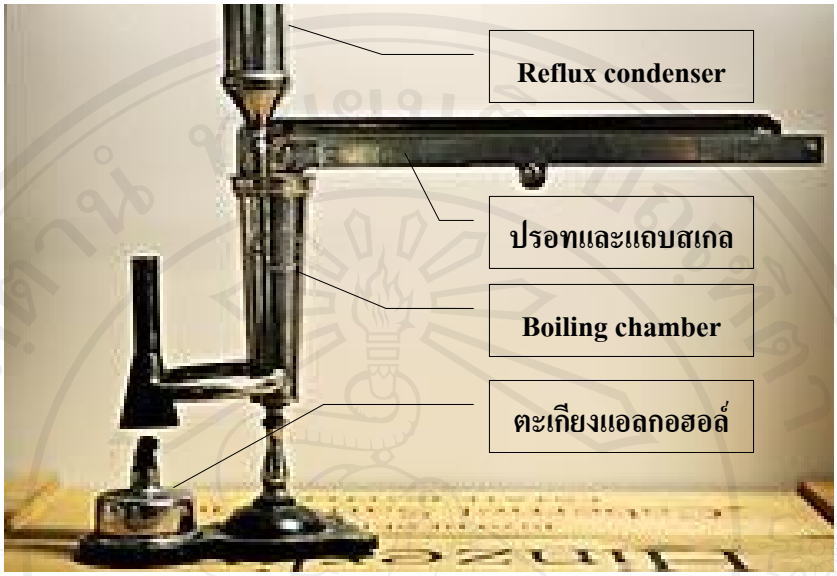
การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้เครื่องมือ Ebulliometer (Dujardin-salleron) (Iland *et al.*, 2000)

หลักการ

เป็นการวิเคราะห์จุดเดือดของสารละลายผสมระหว่างน้ำและแอลกอฮอล์ เปรียบเทียบกับจุดเดือดของน้ำบริสุทธิ์ ถ้ามีปริมาณของแอลกอฮอล์ในสารตัวอย่างเพิ่มขึ้นจะทำให้จุดเดือดลดลงจากจุดเดือดของน้ำบริสุทธิ์ ผลลัพธ์ที่ได้สามารถนำไปคำนวณเป็นร้อยละของแอลกอฮอล์โดยปริมาตร แต่มีข้อจำกัดอยู่ที่ตัวอย่างที่นำมาวัดต้องมีปริมาณแอลกอฮอล์ไม่เกินร้อยละ 16

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์



ภาพ ก.7 เครื่อง Ebulliometer

ที่มา : Seattle Times (2009)

1. การหาจุดเดือดของน้ำ

เติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 30 มิลลิลิตรใส่ลงใน Boiling chamber ดังภาพ ก.7 ต่อส่วน Reflux condenser จุดตะเกียงแอลกอฮอล์ ต้มจนกระทั่งเดือด อ่านค่าอุณหภูมิของน้ำเดือดเมื่อปรอทขึ้นไปคงที่ ปรับตำแหน่งสเกลให้อ่านค่าจุดเดือดเป็นร้อยละ 0.0 โดยปริมาตรแล้วจึงหยุดการต้มและเทน้ำทิ้ง

2. การหาจุดเดือดของตัวอย่าง

ใส่ตัวอย่างลงใน Boiling chamber จนถึงขีดที่กำหนด ต่อส่วน Reflux condenser แล้วทำการเติมน้ำเย็นลงไปใน Reflux condenser จุดตะเกียงแอลกอฮอล์ ต้มจนกระทั่งเดือด ดูระดับปรอทที่ขึ้นไป และคงที่ โดยค่าที่อ่านได้คือปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่าง

3. การทำความสะอาด

ควรทำความสะอาดทุกครั้งที่เปลี่ยนตัวอย่างที่วิเคราะห์ ในส่วนของ Boiling chamber ถ้ามีคราบสารติดอยู่ให้ทำความสะอาดด้วย ร้อยละ 2 ของสารละลาย NaOH

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Lane and Eynon method (สุทัศน์, 2549)

สารเคมีที่ใช้

1. สารที่ช่วยทำให้ใส (Clearing agents) - ประกอบด้วย

- Carrez I ($ZnOAc.2H_2O$ 21.9 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่มี glacial acetic acid 3 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml)
- Carrez II ($K_4Fe(CN)_6.3H_2O$ 10.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml)

2. สารละลาย Fehling's Solution - ผสม Fehling's solution A และ B , เตรียมทันทีก่อน ใช้

- Fehling's solution A ($CuSO_4.5H_2O$ 69.28 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร)
- Fehling's solution B (NaOH 100 กรัม, $Na.K.H_4C_4O_6.4H_2O$ (Rochelle salt) 346 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร)

3. Methylene Blue 1% (Methylene Blue 1 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml)

การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนอินเวอร์ชั่น (D_1)

1. Preliminary titration

นำตัวอย่างมาทำการเจือจางตามความเหมาะสม (ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาลในตัวอย่าง) บันทึกปริมาตรที่ใช้เพื่อนำไปคำนวณ จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้วใส่ในบิวเรตปลายงอ จากนั้นปิเปตสารละลายผสม Fehling's solution จำนวน 10 มิลลิลิตร(ใช้อย่างละ 5 มิลลิลิตร) หรือ 25 มิลลิลิตร(ใช้อย่างละ 12.5 มิลลิลิตร) ใส่ในฟลาสก์ เติมลูกแก้วเล็กๆ ลงไป 8-10 เม็ด เพื่อกันการเดือดจนล้นออกมา นำฟลาสก์ไปต้มด้วยตะเกียงบุนเซนจนเดือด แล้วจึงนำไปไตเตรทกับสารละลายตัวอย่าง จนสีน้ำเงินจางลง ให้หยดเมธิลีนบลู 2-3 หยด ไตเตรทจนสีฟ้าหายไปหมดเหลือแต่ตะกอนสีแดงส้มของ CuO_2 บันทึกปริมาตรของสารละลายที่ใช้ ทำ 3 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ย

2. Accurate titration

เมื่อได้ความเข้มข้นและปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง ที่ใช้ในการไตเตรทใน Preliminary titration แล้ว (ควรอยู่ในช่วง15-25 มิลลิลิตร) ให้ทำซ้ำเหมือน Preliminary titration โดยให้เติมสารละลายตัวอย่างจากบิวเรต ลงไปในฟลาสก์ที่กำลังเดือดทันทีจากนั้นต้มให้เดือดแล้วหยดเมธิลีนบลู 2-3 หยด ไตเตรทต่อให้เสร็จภายใน 3 นาทีตั้งแต่เริ่มเดือดจนสารละลายเปลี่ยนจากสีฟ้าไปเป็นตะกอนสีแดงส้ม นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลในรูป Invert sugar

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(mg/100ml) จากตาราง ก.1 คำนวณหาปริมาณร้อยละน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนอินเวอร์ชั่น (D_1) กับน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ ด้วยการทำ interpolate ระหว่างค่าปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้กับปริมาณน้ำตาลในรูป Invert sugar แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณเทียบกับน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น

การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังอินเวอร์ชั่น (D_2)

นำสารละลายตัวอย่างที่เหลือมาทำการปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำมา 10-20 มิลลิลิตร เติม HCL 6.34 N จำนวน 10 มิลลิลิตร นำไปอุ่นใน water bath 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว ปรับให้เป็นกลางด้วย NaOH 5 N ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปไตเตรทเหมือนตอนแรก จดปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้ ทำ 3 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ย จากนั้นนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลในรูป Invert sugar จากตาราง ก.1 คำนวณหาปริมาณในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ภายหลังอินเวอร์ชั่น (D_2) ซึ่งค่าที่ได้จะเป็นค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในตัวอย่างอาหารรวมกับน้ำตาลอินเวอร์ส นำค่าปริมาณน้ำตาลที่ได้ (D_1และD_2) มาคำนวณหาปริมาณน้ำตาลดังนี้

$$\textbf{น้ำตาลซูโครส (S, \%)} = (D_2 - D_1) \times 0.95$$

$$\textbf{น้ำตาลทั้งหมด (\%)} = D_1 + S$$

เมื่อ D_1 = ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดก่อนทำอินเวอร์ชั่น (%)

D_2 = ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดหลังทำอินเวอร์ชั่น (%)

S = ปริมาณน้ำตาลซูโครส (%)

การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์

การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. จานเพาะเชื้อ และปิเปตขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร (ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. เครื่องเจือจางตัวอย่าง (stomacher)

3. เครื่องเขย่า

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

1. สายละลายบัฟเฟอร์เปปโตน เข้มข้นร้อยละ 0.1

2. Plate count agar, PCA

วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1. ใช้มีดและปากคีบที่ปราศจากเชื้อโดยการลนไฟ และเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ ตัดตัวอย่างจากหลายๆ ส่วน ชั่งน้ำหนักได้ 25 กรัม ใส่ในถุงตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร (stomacher bag) เป็นเวลา 2 นาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1 : 10 (10^{-1})

1.2. เขย่าอาหารให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1 : 10 (10^{-1}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า จะได้อาหารที่เจือจาง 1 : 100 (10^{-2})

1.3. ทำให้อาหารมีความเจือจาง 1 : 1000 (10^{-3}) และความเจือจางต่อๆ ไป ด้วยวิธีเดียวกันจนถึงความเจือจาง 1 : 1000000 (10^{-6})

2. การใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1. ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายของตัวอย่างที่ความเจือจางต่างๆ ลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร ความเจือจางละ 2 จาน

2.2. เทอาหาร PCA ที่กำลังหลอมเหลว (อุณหภูมิไม่ควรสูงกว่า 48 องศาเซลเซียส) ลงในงานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่าง โดยใส่ลงไปจานละประมาณ 15-20 มิลลิลิตร ให้เสร็จภายในเวลา 15 นาที นับตั้งแต่ความเจือจางเริ่มต้น

2.3. ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันดี วางทิ้งไว้ให้เย็น แล้วคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อลง

2.4. ทำตัวอย่างควบคุม โดยใช้สารละลายเปปโตน 1 มิลลิลิตรแทนสารละลายของตัวอย่างอาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การบ่มเชื้อ บ่มจานอาหารที่เตรียมไว้เสร็จเรียบร้อยแล้วที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 72±3 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48±2 ชั่วโมง

4. การตรวจนับจำนวนโคโลนีและการรายงานผล หลังบ่มเชื้อตามกำหนดแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเชื้อ ที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี รายงานผลการตรวจนับว่า มีจำนวน aerobic bacteria ในรูปโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม (cfu/g)

การตรวจนับยีสต์และเชื้อรา

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. จานเพาะเชื้อ และปิเปตขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร (ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง)
2. เครื่องเจือจางตัวอย่าง (stomacher)
3. เครื่องเขย่า

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

1. สายละลายบัฟเฟอร์เปปโตน เข้มข้นร้อยละ 0.1
2. Potato dextrose agar, PDA

วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1. ใช้มีดและปากคีบที่ปราศจากเชื้อโดยการลนไฟและเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ ทำการตัดตัวอย่างจากหลายๆ ส่วน ชั่งน้ำหนักได้ 25 กรัม ใส่ในถุงตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร (stomacher bag) เป็นเวลา 2 นาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1 : 10 (10^{-1})

1.2. เขย่าอาหารให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง1 : 10 (10^{-1}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า จะได้อาหารที่เจือจาง 1 : 100 (10^{-2})

1.3. ทำให้อาหารมีความเจือจางจนถึง 1 : 1000 (10^{-3}) และความเจือจางต่อๆ ไปด้วยวิธีเดียวกันจนถึงความเจือจาง 1 : 1000000 (10^{-6})

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1. ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายของตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจางต่างๆ ลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร ความเจือจางละ 3 จาน

1.2. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่กำลังหลอมเหลวลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่างโดยใส่ลงไปจานละประมาณ 15-20 มิลลิลิตร รีบเทให้เสร็จภายใน 1 ถึง 2 นาทีหลังจากใส่เชื้อลงไปแล้ว

1.3. ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันดี วางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว

1.4. ทำตัวอย่างควบคุม โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 1 มิลลิลิตรแทนสารละลายของตัวอย่างอาหาร

3. การบ่มเชื้อ บ่มจานอาหารที่เตรียมไว้เสร็จเรียบร้อยแล้วไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 22 ถึง 25 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

4. การตรวจนับจำนวนโคโลนีและการรายงานผล หลังบ่มเชื้อตามเวลากำหนดแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 10-150 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากทั้ง 3 จานเพาะเชื้อ รายงานผลการตรวจนับในรูปโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม (cfu/g)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Acetobacter aceti.*

อาหารเหลว

1. กลูโคส 100 กรัม
2. Yeast extract 10 กรัม
3. น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

อาหารแข็ง

1. กลูโคส 100 กรัม
2. Yeast extract 10 กรัม
3. น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร
4. วุ้น 20 กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง ก.1 ปริมาณน้ำตาล (mg/100ml) ชนิดต่างๆ เมื่อใช้สารละลายเฟลลิ่งผสม 10 ml และ 25 ml

สารละลายน้ำตาลที่ใช้ไตเตรต (ml)	ปริมาณน้ำตาล (mg/100ml) ชนิดต่างๆ เมื่อใช้สารละลายเฟลลิ่งผสม 10 ml และ 25 ml									
	Dextrose		Invert Sugar		Fructose		Hydrate Lactose		Hydrate Maltose	
	10 ml	25 ml	10 ml	25 ml	10 ml	25 ml	10 ml	25 ml	10 ml	25 ml
15	327.0	801.0	336.0	824.0	348.0	849.0	455.0	1150.0	542.0	1388.0
16	307.0	751.0	316.0	772.0	327.0	796.0	426.0	1076.0	507.0	1298.0
17	289.0	707.0	298.0	727.0	308.0	750.0	401.0	1010.0	477.0	1220.0
18	274.0	668.0	282.0	687.0	291.0	708.0	378.0	952.0	450.0	1151.0
19	260.0	633.0	267.0	651.0	276.0	672.0	358.0	900.0	426.0	1088.0
20	247.4	601.5	254.5	619.0	262.5	638.0	340.0	854.5	404.0	1032.3
21	235.8	572.9	242.9	589.5	250.6	608.1	323.8	812.4	384.3	981.6
22	225.5	547.3	231.8	563.2	239.6	580.6	309.1	774.5	366.4	935.5
23	216.1	523.6	222.2	538.7	229.1	555.5	295.4	740.0	350.0	893.2
24	207.4	501.9	213.3	516.7	220.0	532.5	282.9	708.5	335.0	854.5
25	199.3	482.0	204.8	496.0	211.3	511.5	271.6	679.5	321.5	819.0
26	191.8	463.7	197.4	477.3	203.3	491.9	261.0	652.5	308.8	786.3
27	184.9	446.8	190.4	459.7	196.0	474.0	251.1	627.9	297.0	756.0
28	178.5	431.1	183.7	443.6	189.3	457.2	242.1	604.8	286.1	727.9
29	172.5	416.4	177.6	428.3	183.1	441.6	233.8	583.3	276.0	701.7
30	167.0	402.7	171.7	414.3	177.2	427.0	226.0	563.3	266.6	677.3
31	161.8	389.7	166.3	401.0	171.7	413.3	218.7	544.8	257.8	654.3
32	156.9	377.6	161.2	388.7	166.5	400.6	211.9	527.4	249.7	633.1
33	152.4	366.3	156.6	377.0	161.6	388.5	205.6	511.0	241.7	613.0
34	148.0	355.6	152.2	366.2	157.0	377.3	199.6	495.6	234.6	594.3
35	143.9	345.6	147.9	355.8	152.6	366.7	194.0	481.1	227.6	576.5
36	140.0	336.3	143.9	346.1	148.6	356.6	188.6	467.3	221.1	559.7
37	136.4	327.4	140.2	336.8	144.7	347.0	183.5	454.3	215.0	543.9
38	132.9	318.8	136.6	328.1	140.9	338.1	178.7	442.1	209.2	528.9
39	129.6	310.7	133.3	319.7	137.3	329.6	174.1	430.5	203.8	514.7
40	126.5	303.1	130.1	311.9	134.0	321.5	169.7	419.5	198.5	501.3
41	123.6	295.9	127.1	304.4	130.9	313.7	165.9	409.0	193.7	488.5
42	120.8	289.0	124.2	297.3	127.9	306.2	161.9	399.1	188.8	476.3
43	118.1	282.4	121.4	290.5	125.1	299.2	158.1	389.7	184.3	464.7
44	115.5	276.1	118.7	284.1	122.4	292.5	154.7	380.7	180.0	453.6
45	113.0	270.1	116.1	277.9	119.8	286.2	151.3	372.1	175.9	443.0
46	110.6	264.3	113.1	272.0	117.2	280.0	148.0	363.9	172.0	433.1
47	108.4	258.8	111.4	266.3	114.7	274.2	145.1	356.0	168.3	423.6
48	106.2	253.5	109.2	260.8	112.4	268.6	142.1	348.3	164.7	414.4
49	104.1	248.4	107.1	255.5	110.2	263.2	139.2	341.0	161.2	405.5
50	102.2	243.6	105.1	250.6	108.0	258.0	136.6	334.2	158.0	397.2

ที่มา : Egan *et al*. (1981) และ AOAC (1998)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

แบบสอบถาม และแบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แบบสอบถามสำรวจความต้องการของผู้บริโภคที่มีต่อชนิดของน้ำผลไม้ที่เป็นส่วนผสมในเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อน

ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เรียน ท่านผู้ตอบแบบสอบถาม

แบบสอบถามนี้ เป็นการสำรวจความต้องการของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์**เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อน (Mulberry Cider Vinegar Drinks)** เพื่อใช้ประกอบในการทำวิทยานิพนธ์ของ นางสาวเอื้องพลอย ใจลังกา นักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิชาการพัฒนาผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ภายใต้การดูแลของ ผศ.ดร.สุทัศน์ สุระวัง โดยแบบสอบถามมีทั้งหมด **2 หน้า** ซึ่งทางผู้ศึกษาใคร่ขอความกรุณาและขอความร่วมมือจากท่านในการตอบแบบสอบถามให้สมบูรณ์

ตอนที่ 1 ข้อมูลทั่วไปของผู้ตอบแบบสอบถาม

คำชี้แจง กรุณากรอกข้อมูลในแบบสอบถามโดยทำเครื่องหมาย √ หน้าข้อที่ตรงกับท่านมากที่สุด

1. เพศ [ ] ชาย [ ] หญิง

2. อายุ [ ] ต่ำกว่า15 ปี [ ] 15-30 ปี [ ] 31-45 ปี
[ ] 46-60 ปี [ ] มากกว่า 60 ปี

3. อาชีพ [ ] นักเรียน, นักเรียนศึกษา [ ] ข้าราชการ
[ ] นักธุรกิจ [ ] พนักงานเอกชน [ ] พนักงานรัฐวิสาหกิจ
[ ] เกษตรกร [ ] แม่บ้าน [ ] อื่นๆ ระบุ.....

4. ท่านเคยรับประทานผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ (เช่นเครื่องดื่มแอปเปิ้ลไซเดอร์ หรือเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์แดง) มาก่อนหรือไม่

[ ] เคยรับประทาน [ ] ไม่เคยรับประทาน

กรุณาพลิกแบบสอบถามเพื่อทำด้านหลัง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตอนที่ 2 ข้อมูลเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์และแนวทางการพัฒนา

คำชี้แจง กรุณาอ่านทำความเข้าใจเกี่ยวกับข้อมูลของผลิตภัณฑ์ก่อนการทำแบบสอบถามข้อ 6-9

เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลไม้ (Cider Vinegar Drinks) เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่ได้จากการหมักผลไม้ชนิดต่างๆ โดยเป็นเครื่องดื่มมีในต่างประเทศมานานแต่เพิ่งเริ่มเข้ามาในประเทศไทยได้ไม่นานมานี้ ยกตัวอย่างผลิตภัณฑ์ เช่น เครื่องดื่มน้ำแอปเปิ้ลไซเดอร์หรือเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์แดง ในต่างประเทศนิยมบริโภคเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลไม้เพื่อช่วยบำรุงสุขภาพและช่วยบรรเทาโรคต่างๆ เช่น โรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด ช่วยควบคุมน้ำหนักและยังช่วยในกระบวนการย่อยอาหาร

เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อน (Mulberry Cider Vinegar Drinks) คือเครื่องดื่มที่ได้จากการหมักผลหม่อนหรือที่เรียกอีกอย่างว่าผลมัลเบอรี่ (Mulberry) โดยเครื่องดื่มชนิดนี้มีรสชาติค่อนข้างเปรี้ยว มีกลิ่นหอมของผลไม้ที่ใช้หมักและมีรสหวานเล็กน้อย จากรายงานการวิจัยพบว่าผลหม่อนมีคุณสมบัติของการเป็นแหล่งของสารแอนติออกซิแดนซ์อยู่เป็นจำนวนมาก เช่น แอนโทไซยานินและควอเซอทิน ซึ่งสารแอนติออกซิแดนซ์เหล่านี้สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ในร่างกายที่อาจส่งผลให้เกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจ ภาวะข้อต่ออักเสบ ต้อกระจก และการเสื่อมของอวัยวะต่างๆ ได้ (Jin and Ching, 2007 ; Chang *et al*., 2005 ; Kang *et al*., 2006 ; Chen *et al*., 2006)

คำชี้แจง กรุณากรอกข้อมูลในแบบสอบถาม ให้ตรงกับความต้องการของท่านมากที่สุด

5. หากมีการพัฒนาเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อน (มีสีม่วง) โดยมีการผสมน้ำผลไม้ลงไปท่านคิดว่าผลไม้ชนิดใดเหมาะสมและตรงกับความต้องการของท่านมากที่สุดที่จะใช้ในการผสม โดยเรียงลำดับความชอบ 1-3 (1 คือชอบมากที่สุด 3 คือชอบน้อยที่สุด)

[ ] น้ำหม่อน (สีม่วง) [ ] น้ำลิ้นจี่ (สีขาว ขุ่น) [ ] น้ำเสาวรส (สี เหลืองส้ม)

6. เหตุผลที่จะทำให้ท่านตัดสินใจเลือกซื้อผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อนเพราะอะไร โดยเรียงลำดับตามความสำคัญของเหตุผล 1-4 (1 คือเหตุผลที่มีความสำคัญมากที่สุด 4 คือเหตุผลที่มีความสำคัญน้อยที่สุด)

[ ] ความแปลก ใหม่ [ ] มีประโยชน์ต่อสุขภาพ [ ] รสชาติอร่อย

[ ] สีสันสวยงาม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

7. ถ้าหากมีผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อนออกมาจำหน่ายท่านจะซื้อบริโภคหรือไม่ทำเครื่องหมาย √ หน้าข้อที่ตรงกับท่านมากที่สุด

[ ] ซื้อ [ ] ไม่ซื้อ

8.ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

☺ **ขอขอบพระคุณทุกท่าน** ☺

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อผู้ทดสอบ……..……..……เพศ.....อายุ.....อาชีพ.....

แบบสอบถาม

เรื่อง การพัฒนา “เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อน”

ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

<u>ตอนที่1</u> คำชี้แจง กรุณาทดสอบชิม **“เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อน”** ทีละตัวออย่างจากซ้ายไปขวา แล้ว**ให้คะแนน**ในแต่ละคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ตามความความรู้สึกของท่านมากที่สุดตามรหัสของแต่ละตัวอย่าง โดยกำหนดให้

คะแนนความชอบ				**คะแนนความพอดี**	
1	ไม่ชอบอย่างยิ่ง	6	ชอบเล็กน้อย	1	ปรับให้เพิ่มขึ้นมาก
2	ไม่ชอบมาก	7	ชอบปานกลาง	2	ปรับให้เพิ่มขึ้นเล็กน้อย
3	ไม่ชอบปานกลาง	8	ชอบมาก	3	พอดี
4	ไม่ชอบเล็กน้อย	9	ชอบมากอย่างยิ่ง	4	ปรับให้ลดลงเล็กน้อย
5	เฉยๆ			5	ปรับให้ลดลงมาก

คุณลักษณะ	**031**	
	ความชอบ	**ความพอดี**
ความชอบโดยรวม		
กลิ่นน้ำส้มสายชู		
รสเปรี้ยว		
รสหวาน		
ความรู้สึกหลังชิม		

คุณลักษณะ	**247**	
	ความชอบ	**ความพอดี**
ความชอบโดยรวม		
กลิ่นน้ำส้มสายชู		
รสเปรี้ยว		
รสหวาน		
ความรู้สึกหลังชิม		

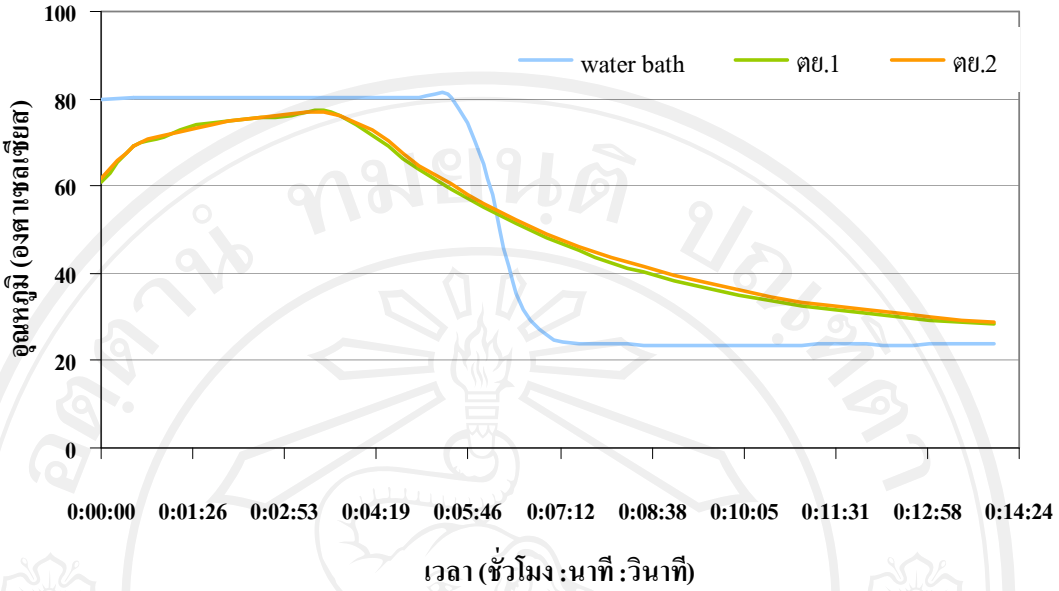
ขอขอบพระคุณทุกท่านที่สละเวลาทำแบบสอบถาม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

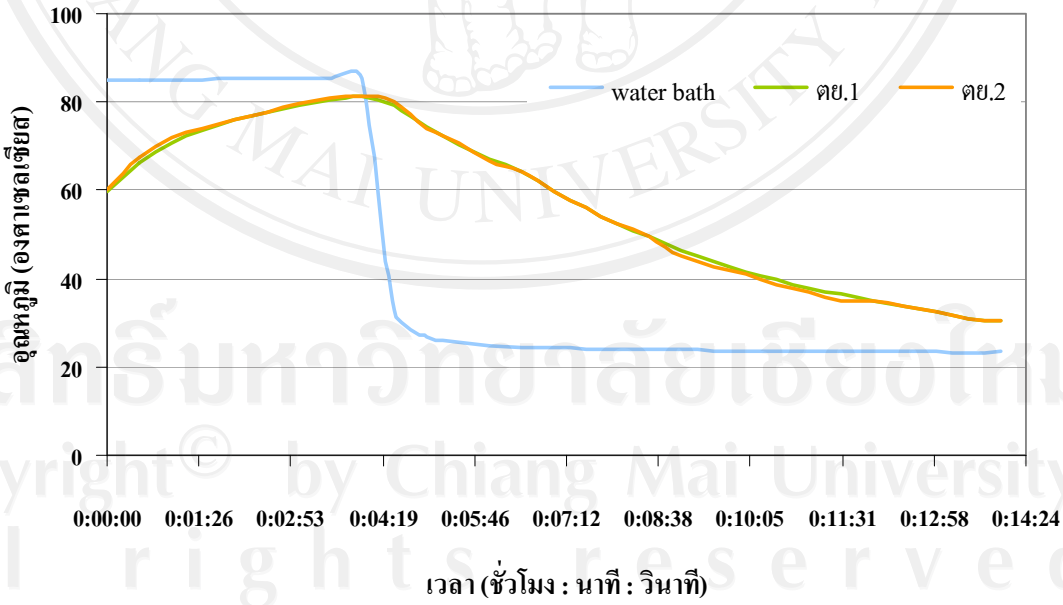
ภาคผนวก ค

กราฟ Process time ในการฆ่าเชื้อเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

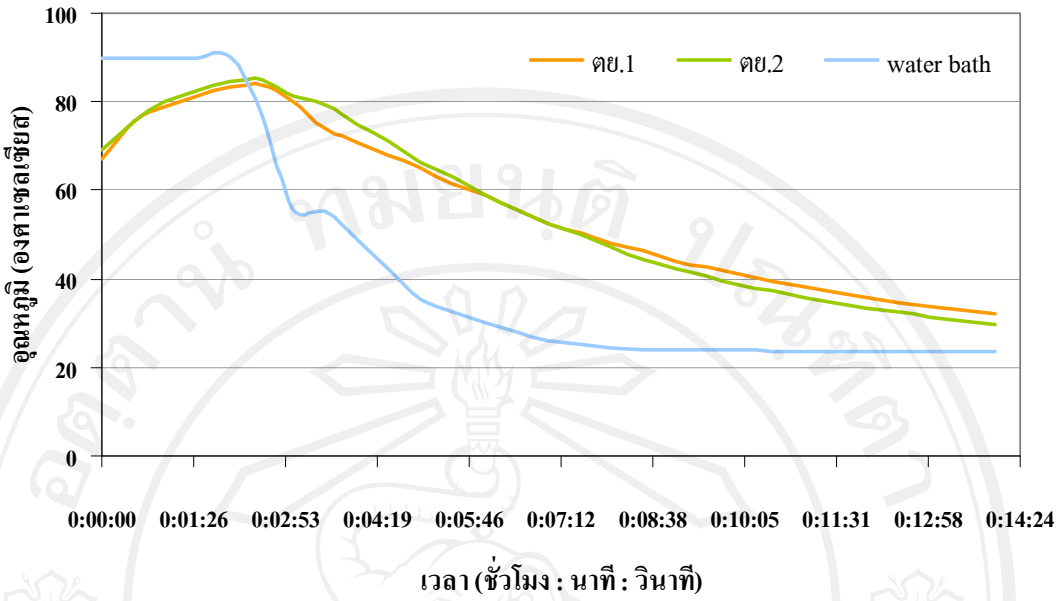


ภาพที่ ค.1 กราฟแสดงอุณหภูมิ และเวลาในกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ของเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อน



ภาพที่ ค.2 กราฟแสดงอุณหภูมิ และเวลาในกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสของเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ ค.3 กราฟแสดงอุณหภูมิ และเวลาในกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสของเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวเอื้องพลอย ใจลังกา
วัน เดือน ปี เกิด	19 กรกฎาคม 2527
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนวัฒโนทัยพายัพ จ.เชียงใหม่ ปีการศึกษา 2545 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2550
ประสบการณ์ทำงาน	ปี พ.ศ. 2551 ผู้ช่วยสอนวิชาปฏิบัติการ การวิเคราะห์ และออกแบบคุณภาพในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ผลงานที่เผยแพร่	- เอื้องพลอย ใจลังกา และสุทัศน์สุระวัง. 2552. *ผลของกระบวนการหมักที่มีต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำส้มสายชูหมักจากผลหม่อน.* เรื่อง เต็มการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 47 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ - Chailangka, A. and Surawang, S. 2009. *Effect of Pasteurization on Antioxidant Contents of Mulberry Vinegars Drinks*. Book of abstracts 11th Agro Industrial Conference, Food Innovation Asia conference. Bangkok.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved