ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ เคมีและจุลินทรีย์

ก 1. การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ

1) การวัดค่าสี (ดัดแปลงจาก Palou *et al.*, 1999)

เครื่องมือ

เครื่องวัดสี ยี่ห้อ Hunter Lab รุ่น Color Quest XT

วิธีการ

1. เลือกโปรแกรม Hunter Lab (L, a, b) illuminate = D65 และ observer = 10^0
2. ทำการปรับมาตรฐานสีโดยใช้แผ่นเทียบสีดำมาตรฐานและน้ำกลั่น
3. รินตัวอย่างใส่ในคิวเวตแล้วนำไปวางในตำแหน่งที่วัดค่าสี
4. ค่าที่อ่านได้เป็นค่า L, a, b

2) การวัดค่าความขุ่น (ดัดแปลงจาก Palou *et al.*, 1999)

เครื่องมือ

เครื่องวัดสี ยี่ห้อ Hunter Lab รุ่น Color Quest XT

วิธีการ

1. เลือกโปรแกรมการทะลุผ่านของแสง (transmittance)
2. ทำการปรับมาตรฐานโดยใช้แผ่นเทียบสีดำมาตรฐานและน้ำกลั่น
3. รินตัวอย่างใส่ในคิเวตแล้วนำไปวางในตำแหน่งที่วัดค่าการทะลุผ่านของแสง
4. อ่านค่าการทะลุผ่านของแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm

3) การหาความหนืดโดยใช้ Capillary viscometer

เครื่องมือ

เครื่องวัดความหนืดแบบ Capillary ยี่ห้อ Scotth รุ่น 531-10

วิธีการ

1. เตรียมสารละลายที่ต้องการวัด ปริมาตร 2 ml เทสารละลายลงในกระเปาะของอุปกรณ์ตำแหน่ง A
2. นำจุกยางครอบไว้ที่ตำแหน่งB ดูดสารละลายให้เคลื่อนที่ขึ้นไปอยู่เหนือระดับตำแหน่ง C

3. จับเวลาการไหลของสารละลายเริ่มจับเวลา t = 0และ t = tใดๆ เมื่อสารละลายเคลื่อนจาก C ถึง D
4. ทำการทดลองซ้ำ ข้อ 2 และข้อ 3 จำนวน 5 ครั้ง
5. นำเวลาที่บันทึกได้ทั้งหมดมาหาค่าเฉลี่ย เพื่อนำไปแทนค่าในสมการความหนืดของสาร
6. สมการหาความหนืดของสาร มีดังนี้

$$\eta = D\kappa t_{mean} \qquad [ก.1]$$

เมื่อ η = ความหนืดของสารละลาย

κ = ค่าคงที่ของอุปกรณ์การวัด มีค่า 0.01 ($m^2.s^{-2}$)

t_{mean} = เวลาเฉลี่ยที่สารละลายใช้ในการเคลื่อนที่ จาก C ถึง D (s)

D = ความหนาแน่นของสารละลาย ($kg.m^{-3}$)

หาค่าจากสมการ $D = \frac{M}{V}$ [ก.2]

เมื่อ M = มวลของสารละลาย ซึ่งหาได้จากการนำสารละลายปริมาตร 2 มิลลิลิตรไปชั่ง ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (kg)

V = ปริมาตรของสารละลาย (m^3)

ก 2. การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี

1) การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry method (Lowry *et al.*, 1951)

สารเคมี

1. สารละลาย A : โซเดียมคาร์บอเนต ร้อยละ 2 ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล
2. สารละลาย B : $CuSO_4$. $5H_2O$ ร้อยละ 0.5 ในสารละลาย Sodium Potassium Tartate ร้อยละ 1
3. สารละลาย C : นำสารละลาย B จำนวน 1 ml + สารละลาย A จำนวน 50 ml
4. สารละลาย D : นำสารละลาย Folin-Ciocalteus Phenol reagent 1 ml มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น (1:1) ก่อนใช้

วิธีการ

1. นำสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) เข้มข้น 0.1 mg/10 ml (stock solution เข้มข้น 1000 µg/ml) เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 และ 400 µm/ml
2. เติมสารละลาย C 5 ml เขย่าทิ้งไว้ 10 นาที
3. เติมสารละลาย D ปริมาตร 0.2 ml เขย่าทิ้งไว้ 30 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนมาตรฐาน และค่าการดูดกลืนแสง
5. เจือจางตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยน้ำกลั่น แล้วดำเนินการทดลองตามวิธีการข้อ 1-4

2) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Lane และ Eynon (A.O.A.C., 1990)

อุปกรณ์

1. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 ml
2. ปิเปต ขนาด 10 และ 50 ml
3. บิวเรต ขนาด 50 ml
4. เตาให้ความร้อน
5. กระดาษกรองเบอร์ 1

สารเคมี

1. สารละลายเฟลิง A : ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟตจำนวน 69.28 g ละลายในน้ำกลั่นแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปจนปริมาตรครบ 1000 ml กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4
2. สารละลายเฟลิง B : ชั่งโพแทสเซียมโซเดียมทาเทรตเตตราไฮเดรต จำนวน 346 g และโซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 100 g แล้วละลายในน้ำกลั่นจำนวนเล็กน้อยปรับปริมาตรโดยเติมน้ำกลั่นลงไปจนมีปริมาตร 1000 ml
3. สารละลานเดกซ์โทรส : ชั่งเดกซ์โทรสบริสุทธิ์ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 3.0 g ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml
4. เมทิลีนบลู ความเข้มข้นร้อยละ 1 : ชั่งเมทิลีนบลู 1.0 g ละลายในน้ำกลั่นแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปจนปริมาตรครบ 100 ml
5. สารละลายนิวทรัลเลตอะซิเตตความเข้มข้นร้อยละ 10 : ชั่งนิวทรัลเลตอะซิเตต 50 g ละลายในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปจนปริมาตรครบ 500 ml

6. สารละลายโปแตสเซียมออกซาเลตความเข้มข้นร้อยละ 10 : ชั่งโปแตสเซียมออกซาเลตหนัก 50 g ละลายในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 500 ml
7. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น
8. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 10 : ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 g ละลายในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 ml

วิธีการ

การหาค่ามาตรฐานของสารละลายเฟลิง

ก. การไตเตรตหาค่ามาตรฐานเบื้องต้น (Preliminary determination)

1. ปิเปตสารละลายเฟลิงเอและบี อย่างละ 5 ml ใส่รวมกันในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml
2. เติมสารละลายเดกซ์โทรสจากบิวเรตลงไปประมาณ 15 ml เขย่าให้เข้ากัน
3. ต้มให้เดือดโดยเร็ว เมื่อเดือดได้ประมาณ 15 วินาที เติมสารละลายเมทิลีนบลูลงไป 2-3 หยด ซึ่งควรจะเกิดสีน้ำเงินชัดเจน (ถ้าไม่เกิดสีน้ำเงินแสดงว่าใช้เดกซ์โทรสหรือตัวอย่างน้ำตาลมากเกินไปให้ทำใหม่โดยลดปริมาณของเดกซ์โทรสหรือตัวอย่างน้ำตาลลง)
4. ไตเตรตจนสีน้ำเงินของเมทิลีนบลูเปลี่ยนไปเป็นสีแดงอิฐ (ณ จุดยุติ) ในระหว่างการไตเตรตนี้ต้องให้สารละลายในขวดรูปชมพู่เดือดและควรเขย่าให้เข้ากันตลอดเวลา
5. บันทึกปริมาตรของสารละลายเดกซ์โทรสที่ใช้ในการไตเตรตตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงจุดยุติ

ข. การไตเตรตหาค่ามาตรฐานที่แน่นอน (Accurate determination)

1. ทำเช่นเดียวกับวิธีการไตเตรตเบื้องต้น แต่เติมสารละลายเดกซ์โทรสลงไปในขวดรูปชมพู่จนเกือบจะถึงจุดยุติ (ให้น้อยกว่าจุดยุติของการหาค่ามาตรฐานเบื้องต้นประมาณ1 ml)
2. ตั้งไฟต้มให้เดือดโดยเร็ว ปล่อยให้เดือดอย่างสม่ำเสมอ 2 นาที
3. เติมสารละลายเมทิลีนบลูลงไป 2-5 หยด
4. ไตเตรตโดยเติมสารละลายเดกซ์โทรสครั้งละ 2-3 หยด จนกระทั่งถึงจุดยุติ การไตเตรตนี้ต้องให้เสร็จภายใน 1 นาที หลังจากเติมเมทิลีนบลูและต้องให้สารละลายในขวดรูปชมพู่เดือดตลอดเวลาพร้อมทั้งเขย่าให้เข้ากันเสมอ
5. บันทึกปริมาตรของสารละลายเดกซ์โทรสที่ใช้ในการไตเตรตและคำนวณค่าแฟคเตอร์ของสารละลายเฟลิง ได้ดังนี้

แฟคเตอร์ (F) = ปริมาตรของตัวไตเตอร์ x น้ำหนักเดกซ์โทรส (g) ใน 10 ml

การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลอินเวอร์ทในน้ำตาลโตนด

1. ชั่งน้ำตาลโตนดให้รู้ค่าน้ำหนักที่แน่นอน (ประมาณ 120 g) แล้วเทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น
2. เติมสารละลายนิวทรัลเลดอะซิเตตเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 25 ml แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 250 ml
3. เขย่าให้เข้ากันแล้วกรองดูดส่วนที่กรองได้ 100 ml ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 250 ml
4. เติมสารละลายโปแตสเซียมออกซาเลตความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 10 ml และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรสุดท้าย 250 ml
5. เขย่าให้เข้ากันแล้วกรองแบ่งส่วนที่กรองได้ ออกเป็นสองส่วน โดยส่วนหนึ่งประมาณ 150 ml เก็บไว้สำหรับไตเตรตตามวิธีในข้อ ก. ส่วนที่สองสำหรับหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ดังนี้
   5.1 ดูดส่วนที่กรองได้มา 20 ml ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 250 ml
   5.2 เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 ml
   5.3 นำไปอุ่นบนอ่างน้ำควบคุมที่อุณหภูมิ 70°C นาน 15 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส
   5.4 ทำให้เย็นลงและทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 250 ml
   5.5 นำมาไตเตรตกับสารละลายเฟลิง ตามวิธีในข้อ ก. (ปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ในการไตเตรตนี้ต้องอยู่ในช่วง 15-50 ml จึงจะใช้ได้ ถ้าต่ำหรือสูงกว่านี้ต้องเพิ่มน้ำหนักน้ำตาลโตนดสดที่ใช้หรือต้องเจือจางสารละลายน้ำตาลที่ใช้ในการไตเตรตนั้นใหม่ให้ได้ความเข้มข้นพอเหมาะ)

การคำนวณ

$$\text{น้ำตาลรีดิวซ์ (ร้อยละ)} = \frac{F \times 100 \times 250 \times 250}{W \times 100 \times v} \qquad [ก.3]$$

$$\text{น้ำตาลทั้งหมด (ร้อยละ)} = \frac{F \times 100 \times 250 \times 250 \times 250}{W \times 100 \times 20 \times v} \qquad [ก.4]$$

เมื่อ F = แฟคเตอร์ของสารละลายเฟลิง

W = น้ำหนักน้ำตาลสด (g)

V = ปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ในการไตเตรต (ml)

3) การหาค่ากรด (A.O.A.C., 1990)

สารเคมี

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 N : ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ ประมาณ 4 g ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1000 ml โดยน้ำกลั่น
2. สารละลายฟีนอฟทาลีน : ชั่งฟีนอฟทาลีนจำนวน 1 g ละลายในแอลกอฮอล์ปริมาตร 70 ml ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml โดยใช้น้ำกลั่น

วิธีการ

การหาความเข้มข้นมาตรฐานสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

1. นำโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลตใส่ในกระจกนาฬิกาไปอบในตู้อบไฟฟ้าอุณหภูมิ 110 °C นาน 1-2 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น
2. ชั่งน้ำหนักให้ได้แน่นอน 0.8 g (สำหรับหาความเข้มข้น 0.1 N) ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml
3. เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากคาร์บอเนตปริมาตร 25 ml
4. นำไปไตเตรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ข้างต้น โดยใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์
5. คำนวณหาความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

$$\text{ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์มอล)} = \frac{W}{V \times 0.2042} \quad [ก.5]$$

เมื่อ W = น้ำหนักของโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลต (g)

V = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรต (ml)

สมมูลของโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลต = 204.216

การหาปริมาณกรดทั้งหมด

1. ปิเปตน้ำตาลโตนดสด 10-20 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml
2. หยดฟีนอฟทาลีนร้อยละ 1 ลงไป 5 หยด
3. ไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 N จนกระทั่งกลายเป็นสีชมพูอ่อนถาวร (ณ จุดยุติ)
4. คำนวณปริมาตรกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติก

ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละ) = $\frac{N \times V(NaOH) \times 90 \times 100}{1000 \times V(sample)}$ [ก.6]

เมื่อ N = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

V (NaOH) = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรต

V (sample) = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ (ml)

น้ำหนักกรัมสมมูลของกรดแลคติก = 90

4) การหาค่าพีเอช

เครื่องมือ

เครื่อง pH meter

วิธีการ

นำน้ำตาลโตนดที่ต้องการวิเคราะห์ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C และนำไปวัดค่าพีเอชด้วยเครื่อง pH meter

5) การหาค่าของแข็งทั้งหมด

เครื่องมือ

1. ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ
2. Aluminium can
3. เดซิเคเตอร์

วิธีการ

1. นำ aluminium can อบที่อุณหภูมิ 120 °C นาน 3 ชั่วโมง เพื่อไล่ความชื้นใน aluminium can ปล่อยให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนัก บันทึกผล (M1)
2. เติมน้ำตาลโตนด 3-5 g ใน aluminium can นำไปอบที่ 70 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนัก (M2)
3. คำนวณหาปริมาณของแข็งทั้งหมดจาก

ปริมาณของแข็งทั้งหมด (%) = (M1-M2) x100 [ก.7]

6) การหาค่าของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด

เครื่องมือ

เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (Hand refractometer)

วิธีการ

นำน้ำตาลโตนดที่ต้องการวิเคราะห์ ไปวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดด้วยเครื่อง Hand refractometer

ก 3. การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

1) จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Kiss, 1984)

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 : ละลายเปปโตนในน้ำกลั่น ปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที
2. อาหารพีซีเอ (plate count agar): ละลายส่วนผสมของทริปโตน 5 g ยีสต์เอ็กแทร็กซ์ 2.5 g กลูโคส 1 g และผงวุ้น 15 g ในน้ำกลั่น 1 L คนให้เข้ากัน ต้มจนสารละลายเดือดแล้วปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.1 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

วิธีการ

1. นำน้ำตาลโตนดสดมาทำการเจือจางโดยใช้ สารละลายเปปโตนเข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ
2. ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 1 ml ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และเทอาหารพีซีเอที่เหลว (อุณหภูมิ 45-50 °C) ปริมาตร 20 ml ลงในจานที่มีตัวอย่างอยู่
3. ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับตัวอย่างให้เข้ากัน โดยการเขย่าไปมา วางจานไว้จนอาหารแข็งตัว กลับจาน
4. นำไปวางในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
5. ตรวจนับโคโลนี
6. คำนวณจุลินทรีย์ทั้งหมดในหน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร

2) จำนวนยีสต์และรา (Kiss, 1984)

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 : ละลายเปปโตนในน้ำกลั่นปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. อาหารพีดีเอ (Potato dextrose agar): ละลายส่วนผสมของน้ำสกัดมันฝรั่ง (มันฝรั่ง 200 g ต้มในน้ำ 400 ml) เด็กโทรส 20 g ผงวุ้น 15 g ในน้ำกลั่น 1 L คนให้เข้ากัน ต้มจนสารละลายเดือดแล้ว ปรับพีเอชให้ เท่ากับ 7.1±0.1 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

วิธีการ

1. นำน้ำตาลโตนดมาทำการเจือจางโดยใช้สารละลายเปปโตนเข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ
2. ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และเทอาหารพีดีเอที่เหลวและปรับค่าพีเอชเท่ากับ 3.7-4.7 (อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในจานที่มีตัวอย่างอยู่
3. ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับตัวอย่างให้เข้ากัน โดยการเขย่าไปมา วางจานไว้จนอาหารแข็งตัวกลับจาน
4. นำไปวางในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน
5. ตรวจนับจำนวนโคโลนี
6. คำนวณจำนวนยีสต์และราในหน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร

3) จำนวนแลกติกแบคทีเรีย (Kiss, 1984)

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 : ละลายเปปโตนในน้ำกลั่น ปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที
2. อาหารเอ็มอาร์เอส (MRS agar): ละลายส่วนผสมของอาหารเอ็มอาร์เอสมนรูปอาหารสำเร็จทางการค้า และเติมผงวุ้น 15 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้เข้ากัน ต้มจนสารละลายเดือด แล้วปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.1 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

วิธีการ

1. นำน้ำตาลโตนดสดมาทำการเจือจางโดยใช้สารละลายเปปโตนเข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ
2. ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และเทอาหารเอ็มอาร์เอสเหลว (อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในจานที่มีตัวอย่างอยู่

3. ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับตัวอย่างให้เข้ากัน โดยการเขย่าไปมา วางจานไว้จนอาหารแข็งตัว กลับจาน
4. นำไปวางในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
5. ตรวจนับจำนวนโคโลนีเฉพาะแลกติกแบคทีเรีย ซึ่งรอบๆโคโลนีจะมีโซนสีเหลืองใส ตรวจนับจำนวนโคโลนี

   คำนวณจำนวนแลกติกแบคทีเรียในหน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ข การคำนวณ

1. การคำนวณค่าฟลักซ์

จากการทดลองสามารถคำนวณค่าฟลักซ์ที่เวลาใดๆ ได้จากสมการ[ข.1]

$$\frac{dV}{Adt} = \frac{-TMP}{\mu R_t} \qquad [ข.1]$$

เมื่อ V_i = ปริมาตรของตัวอย่างที่เวลาใดๆ (m^3)

t = เวลา (s)

TMP = ความดันขับ (Pa)

A = พื้นที่การกรองของเมมเบรน (m^2)

R_t = ความต้านทานรวม (m^{-1})

μ = ความหนืดของสารละลาย (Pa.s)

2. การคำนวณความต้านทาน

จากการทดลอง ได้แยกความต้านทานการไหลของเพอมิเอทเป็น

i. ความต้านทานของเมมเบรน (R_m)
ii. ความต้านทานเนื่องจากการเกิดฟาวลิ่ง (R_{fir})
iii. ความต้านทานเนื่องจากชั้นโพลาไรท์เซชั่น (R_{fr})

ดังนั้นความต้านทานรวม (R_t) ในสมการที่ [ข.2] ประกอบด้วย

$$R_t = R_m + R_{fr} + R_{fir} \qquad [ข.2]$$

ซึ่งความต้านทานแต่ละตัวสามารถคำนวณได้ดังนี้

1.) ความต้านทานรวม (R_t) สามารถคำนวณได้จากฟลักซ์ของสารละลายดังสมการที่ [ข.3]

$$R_t = TMP / \mu_p J \qquad [ข.3]$$

เมื่อ TMP = ความดันที่ให้กับระบบ (Pa)

J = ฟลักซ์ของสารละลาย ($m^3/m^2.s$)

μ_p = ความหนืดของสารละลาย (Pa.s)

2.) ความต้านทานเมมเบรน (R_m) สามารถคำนวณได้จากฟลักซ์ของน้ำกรองจากสมการ

$$R_m = TMP / \mu_w J_w \qquad [ข.4]$$

เมื่อ TMP = ความดันที่ให้กับระบบ (Pa)

J_w = ฟลักซ์ของน้ำกรองก่อนการใช้งาน ($m^3/m^2.s$)

μ_w = ความหนืดของน้ำกรอง (Pa.s)

หลังจากการใช้งานแล้วจะทำการล้างเมมเบรนด้วยน้ำกรองเพื่อกำจัดชั้นโพลาไรเซชั่น ดังนั้นค่าความต้านทานของชั้นโพลาไรซ์ถูกกำจัดออกไป ค่าความต้านทานที่เหลืออยู่ คือ ความต้านทานเมมเบรน (R_m) และความต้านทานของฟาวลิ่ง (R_{fir}) ซึ่งสามารถหาได้จากสมการที่ [ข.5]

$$R_m + R_{fir} = TMP / \mu_w J'_w \qquad [ข.5]$$

เมื่อ J'_w = ฟลักซ์ของน้ำกรองหลังจากที่ล้างเมมเบรนด้วยน้ำกรอง ($m^3/m^2.s$)

3.) ความต้านทานของชั้นโพลาไรซ์ (R_{fr}) สามารถคำนวณโดยการแทนค่าของสมการที่ [ข.3] และ [ข.5] ลงในสมการที่ [ข.2]

4.) ความต้านทานของฟาวลิ่ง (R_{fir}) สามารถคำนวณโดยการแทนค่าของ R_m จากสมการ [ข.4] ลงในสมการ [ข.5] จะได้ดังนี้

$$R_{fir} = TMP / (\mu_w J'_w) - R_m \qquad [ข.6]$$