ภาคผนวก ก
รูปภาพประกอบในการผลิต ผลิตภัณฑ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ ก.1 ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกผสมเนื้อเลาะกระดูกโครงไก่ คอเลสเตอรอลต่ำที่ผลิตจากน้ำมันดอกทานตะวัน

ภาพที่ ก.2 ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกทั่วไปที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ ก.3 แสดงลักษณะโครงกระดูกไก่ที่ใช้ผลิตเนื้อเลาะโครงกระดูกไก่ด้วยเครื่องจักร

ภาพที่ ก.4 แสดงลักษณะเนื้อเลาะกระดูกไก่ที่ใช้ในการผลิตไส้กรอกผสมเนื้อเลาะกระดูกไก่ด้วยเครื่องจักร คอเลสเตอรอลต่ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ ก.5 แสดงลักษณะน้ำมันดอกทานตะวันที่ผ่านการแช่แข็งที่ –13 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง

ภาพที่ ก.6 แสดงเครื่องปรุงที่ใช้ในการผลิตไส้กรอก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ ก.7 แสดงเครื่องสับผสมที่ใช้ในการผลิตไส้กรอก

ภาพที่ ก.8 แสดงเครื่องอัดไส้กรอกที่ใช้ในการผลิตไส้กรอก (Stuffer)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข
แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

คำอธิบายประกอบการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส

คำอธิบายลักษณะของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกมีดังนี้

1. สีแดง

พิจารณาจากสีแดงโดยรวมของผลิตภัณฑ์ไส้กรอก ซึ่งโดยทั่วไปจะมีสีแดงเกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีของสารไนไตร์ทร่วมกับสารสีที่มีอยู่ในเนื้อสัตว์และจากการเติมอังคักหรือข้าวแดง

2. กลิ่นเครื่องเทศ

พิจารณาจากกลิ่นเครื่องเทศที่เกิดจากการเติมแต่งเครื่องเทศทั้ง 6 ชนิดตามสูตร ได้แก่ พริกไทย ลูกจันทน์ ดอกจันทน์ ปาริกา เมล็ดผักชี และเมล็ดยี่หร่า ซึ่งผสมกันในอัตราส่วนที่กำหนดไว้แล้ว ดังนั้นกลิ่นเครื่องเทศที่เพิ่มขึ้นเกิดจากเครื่องเทศทั้ง 6 ชนิดที่มีปริมาณมากขึ้น

3. กลิ่นเนื้อ

พิจารณาจากกลิ่นเนื้อของไส้กรอก ซึ่งเป็นกลิ่นของเนื้อที่ผ่านการปรุงด้วยเครื่องเทศชนิดต่างๆ จนถึงกระบวนการให้ความร้อน เครื่องปรุงหรือส่วนผสมอื่นๆ ที่เติมลงไปอาจช่วยในการลดหรือเพิ่มกลิ่นเนื้อได้

4. รสเค็ม

พิจารณาจากรสเค็มของผลิตภัณฑ์ ซึ่งเกิดจากการเติมเกลือลงไปในผลิตภัณฑ์ เพื่อสกัดโปรตีนจากเนื้อและเพิ่มรสชาติของผลิตภัณฑ์อีกด้วย

5. ความเป็นเนื้อเดียวกัน

พิจารณาจากเนื้อไส้กรอกที่มีความเนียน เรียบ เข้ากันได้ดี ไม่แตกออกจากกัน

6. ความแน่นเนื้อ

พิจารณาจากแรงที่ใช้ในการกัดเนื้อไส้กรอก การเกาะตัวของอนุภาคภายในเนื้อไส้กรอก

7. ความฉ่ำน้ำ

พิจารณาจากความฉ่ำของเนื้อไส้กรอก ถ้ามีความฉ่ำสูงแสดงว่าไส้กรอกสามารถอุ้มน้ำได้ในปริมาณมาก

8. การยอมรับโดยรวม

เป็นการประเมินความชอบและการยอมรับของผลิตภัณฑ์โดยการพิจารณาจากลักษณะทั้งประการที่กล่าวมา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

แบบสอบถาม

การทดสอบเค้าโครงผลิตภัณฑ์

แบบสอบถามนี้ จัดทำเพื่อหาเค้าโครงของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกไก่ผสมเนื้อเลาะกระดูกไก่ ด้วยเครื่องจักร คอเลสเตอรอลต่ำ ผู้กรอกแบบสอบถามเป็นผู้กำหนดหัวข้อลักษณะไส้กรอกและรายละเอียด โดยให้ทำเครื่องหมาย X ที่ระดับความเข้มที่ลักษณะดังกล่าวปรากฏอยู่ และเครื่องหมาย I ที่ระดับความเข้มดีเลิศหรือดีที่สุดที่ลักษณะ นั้นควรปรากฏบนสเกล ซึ่งเป็นค่าในอุดมคติ

ลักษณะปรากฏภายนอก

.....

.....

.....

ลักษณะเนื้อสัมผัส

.....

.....

.....

กลิ่นและรสชาติ

.....

.....

.....

อื่นๆ

.....

.....

.....

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

แบบสอบถาม

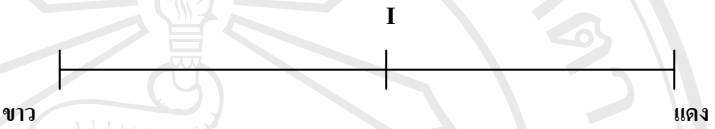
การทดสอบทางประสาทสัมผัส

ชื่อ……วันที่……เดือน……พ.ศ…….

ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการพัฒนา คือ ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกผสมเนื้อเสาะกระดูกไก่ด้วยเครื่องจักรคอเลสเตอรอลต่ำ โปรดทำเครื่องหมาย X ที่ระดับความเข้มที่ลักษณะดังกล่าวปรากฏอยู่ และเครื่องหมาย I คือระดับความเข้มดีเลิศหรือดีที่สุดของลักษณะ ซึ่งเป็นค่าในอุดมคติ

ลักษณะปรากฏภายนอก

สีแดง



ลักษณะเนื้อสัมผัส

ความแน่นเนื้อ

ความเป็นเนื้อเดียวกัน

ความฉ่ำน้ำ

กลิ่นและรสชาติ

รสเค็ม

กลิ่นเนื้อ

กลิ่นเครื่องเทศ

การยอมรับรวม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

วิธีการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

การวัดค่าเนื้อสัมผัส (Texture Analyzer : Model TA. XTPlus, U.K.)

วิธีการวัด

วัดค่าแรงเฉือนโดยใช้ probe ชนิด Warner Batzler Meat Compression วัดค่าแรงเฉือน (Shear force) จากค่าระดับของกราฟ (Peak load) (นิวตัน) โดยทำการปรับค่ามาตรฐาน (Calibrate) เครื่องก่อน แล้วติดตั้งหัวตัด (Probe) เพื่อใช้วัดทดสอบระยะในการตัดระหว่างหัวตัดและตัวอย่าง เพื่อให้ตัดตัวอย่างได้ขาดออกจากกันอย่างสมบูรณ์ ซึ่งตั้งค่าระยะทางเท่ากับ 5 เซนติเมตร โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของไส้กรอกเท่ากับ 2.3 เซนติเมตรขนาดความยาวประมาณ 4 เซนติเมตรตั้งความเร็วในการเคลื่อนที่ของหัวตัดเท่ากับ 100 มิลลิเมตรต่อวินาที ตั้งค่าให้เครื่องย้อนกลับมาที่จุดเริ่มต้นอีกครั้ง (Return) เมื่อเสร็จสิ้นการทดสอบต่อหนึ่งตัวอย่าง เมื่อตั้งค่าต่างๆเรียบร้อยแล้วกดเริ่มการทดลอง (Start probe) จะเริ่มเคลื่อนที่ลงเพื่อตัดไส้กรอก บันทึกค่าระดับของกราฟที่ได้ซึ่งมีหน่วยเป็นนิวตัน ทำการทดสอบ 4 ซ้ำ

การวัดค่าสี ระบบ Hunter Lab (Minolta Camera, Chroma Meter CR-310, Japan)

ขั้นตอนในการใช้เครื่อง Colorimeter

1. เสียบปลั๊กของเครื่อง Colorimeter
2. เปิดเครื่อง Colorimeter
3. ทำการ Calibrate เครื่อง Colorimeter
4. เปลี่ยนระบบเป็น LAB (แล้วแต่การเลือกใช้งาน)
5. กดปุ่ม Color Space ของเครื่อง Colorimeter
6. วางตัว Probe ตั้งตรงบนตัวอย่างอาหารที่จะใช้วัดสี แล้วกดปุ่มที่ตัว Probe 1 ครั้ง เครื่องจะทำการวัด 3 ค่า
7. กดปุ่ม All Data Clear และกด Enter
8. ผลในการวัด ตัวเครื่องจะถูกพิมพ์ออกมาให้
9. กดปุ่ม Statistic และกด Enter
10. กดปุ่ม Data Clear
11. เมื่อใช้เครื่องเสร็จแล้ว จะต้องปิดเครื่องก่อน แล้วจึงถอดปลั๊ก
12. ทำความสะอาดตัวเครื่อง Colorimeter และ Probe ให้สะอาด หลังจากใช้งานเสร็จ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยในการวัดควรวัดใน 1 ตัวอย่างหลาย ๆ ซ้ำ เพื่อให้เกิดความคลาดเคลื่อนของผลที่ได้น้อยที่สุด และการวัดควรวัดตัวอย่างละ 2-3 จุดขึ้นไป

ค่าสีในระบบ Hunter Lab นั้น ค่า L (Lightness) คือค่าความสว่าง มีค่าตั้งแต่ 0 หมายถึงสว่างน้อย มีค่า 100 หมายถึงสว่างมาก ค่าสี a (Redness) คือค่าสีแดง-เขียว ค่าเป็นบวกหมายถึงสีแดง ค่าเป็นลบหมายถึงสีเขียว ค่าสี b (Yellowness) คือค่าสีเหลือง-น้ำเงิน ค่าเป็นบวกหมายถึงสีเหลือง ค่าเป็นลบหมายถึงสีน้ำเงิน (Hutchings, 1999; Fabre et al., 1993)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

การวัดค่า pH (AOAC, 2003)

ก่อนวัดค่า pH จะต้องตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องมือด้วยสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.00 และ 7.00 เตรียมตัวอย่างสำหรับวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ตัวอย่างผสมกับน้ำกลั่นบริสุทธิ์ในอัตราส่วน 1ต่อ10 หากตัวอย่างเป็นของแข็งต้องทำการบดให้ละเอียดก่อนแล้วจึงนำไปผสมกับน้ำกลั่นบริสุทธิ์ จากนั้นนำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง พีเอช มิเตอร์

การวัดค่าน้ำที่เป็นประโยชน์ (a_w) ทำการวัดด้วยเครื่อง AQUA LAB (Model CX3TE : Devices, U.S.A.)

ก่อนทำการวัดค่าต้องทำการปรับมาตรฐาน(Calibrate) เครื่องก่อน โดยการใช้ตัวอย่างมาตรฐานที่มีค่า a_w เท่ากับ 0.75, 0.53, 0.98 และ 0.90 แล้วจึงใส่ตัวอย่างที่บดละเอียดลงไปในตลับ โดยใส่ตัวอย่างในระดับประมาณ 1 ใน 3 ของตลับและเกลี่ยให้ทั่ว ใส่ตลับวัดค่าลงในเครื่องทำการวัดค่า a_w โดยรอให้เกิดสภาวะสมดุลนานประมาณ 30 นาที แล้วจึงอ่านค่าที่ปรากฏและ จดบันทึกผล

การวิเคราะห์หาความชื้น (AOAC, 2003)

วิธีทำ

ชั่งตัวอย่างให้ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 5 กรัม ใส่ลงในจานโลหะที่ผ่านการอบและทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว เติมทรายที่อบแห้งและทราบน้ำหนักที่แน่นอนใส่ลงไป นำจานโลหะไปอบในตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้แน่นอนที่ 100-105 องศาเซลเซียส นานประมาณ 3 ชั่วโมง นำออกมาจากตู้อบและปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น (Desiccators) แล้วชั่งหาน้ำหนัก นำไปอบซ้ำหลายๆ ครั้งจนได้น้ำหนักที่คงที่ ซึ่งค่าที่ได้จะต้องไม่แตกต่างกันเกิน 0.05 กรัม ชั่งหาน้ำหนักของของแข็งที่เหลืออยู่ คำนวณหาน้ำหนักของน้ำที่หายไป และคำนวณหาร้อยละความชื้นดังสูตรนี้

$$\text{ความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักที่หายไป}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้}} \times 100$$

การวิเคราะห์หาเถ้า (AOAC, 2003)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีทำ

เผาจานกระเบื้องซิลิก้าก้นแบน (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7 เซนติเมตร) ในเตาเผา (Muffle furnace) ที่อุณหภูมิ 500-550 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นชั่งน้ำหนักของจานเปล่า

ชั่งตัวอย่างน้ำหนัก 2-5 กรัม ใส่ลงในจานสำหรับหาเถ้า เผาไหม้อาหารจนกระทั่งหมดควันดำด้วยตะเกียงบุนเซน แล้วนำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิประมาณ 500-550 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้เถ้าสีขาวปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งหาน้ำหนักเถ้า คำนวณหาปริมาณเถ้าดังนี้

$$\text{เถ้า (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้า}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

การวิเคราะห์ค่าน้ำหนัก (Cooking yield) (AOAC,2003)

คำนวณได้จากสูตร

$$\text{ค่าน้ำหนัก (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังการทำให้สุก}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนการทำให้สุก}} \times 100$$

การวิเคราะห์หาโปรตีนโดยวิธีเคลดาห์ล (AOAC, 2003)

สารเคมีที่ใช้

1. คะตะลิสต์ผสม (Catalyst mixture)ประกอบด้วยโซเดียมซัลเฟตปราศจากน้ำร้อยละ 96 คอปเปอร์ซัลเฟตร้อยละ 3.5 และเซเลเนียมไดออกไซด์ร้อยละ 0.5
2. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (ปราศจากไนโตรเจน) ร้อยละ 98 (น้ำหนัก/ปริมาตร)
3. สารละลายกรดบอริคความเข้มข้นร้อยละ 2 เตรียมโดยการละลายบอริก 2 กรัมปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร
4. สารละลายเมธิลเรดอินดิเคเตอร์ ประกอบด้วยเมธิลเรดร้อยละ 0.2 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และโบรโมครีซอลกรีนร้อยละ 0.2 (น้ำหนัก/ปริมาตร)ในเอธิลแอกอฮอล์
5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 เตรียมโดยการละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัมปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร
6. สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

วิธีทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชั่งตัวอย่างบดละเอียดประมาณ 2 กรัม (ทราบน้ำหนักแน่นอน) ใส่ใน Kjeldahl digestion flask ขนาด 30-35 มิลลิลิตร ใช้คะตะลิสต์ผสม 8 กรัมและกรดกำมะถันเข้มข้นจำนวน 25 มิลลิลิตร โดยเอียงขวดและค่อยๆรินกรดลงข้างๆหลอดเพื่อล้างตัวอย่างที่อาจติดอยู่ข้างหลอดให้หมดและค่อยๆ เขย่าตัวอย่างเบาๆ นำส่วนผสมทั้งหมดไปย่อยจนใส แล้วให้ความร้อนต่ออีกหนึ่งชั่วโมง ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (ทำ Blank ควบคู่ไปด้วยโดยย่อยเฉพาะกรดและคะตะลิสต์ผสม)

ตั้งทิ้งไว้จนเย็นและไม่มีไอระเหยของกรด จากนั้นนำ Kjeldahl digestion flask ไปต่อกับเครื่องกลั่นโปรตีน นำฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตรที่บรรจุสารละลายกรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร และเมธิเรด 2-3 หยด เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์มารองรับปลายส่วนควบแน่น (Condenser) จุ่มอยู่ต่ำกว่าระดับของสารละลาย

เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้มีปริมาณมาเกินพอ (ประมาณ 60 มิลลิลิตร) ซึ่งจะทำให้สารละลายมีสีดำ หากยังไม่เกิดสีดำให้เติมเพิ่มขึ้นอีก 5-10 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเปิดเครื่องเริ่มทำการกลั่น โดยให้ทำ Blank ก่อนตัวอย่าง แล้วจึงกลั่นตัวอย่าง จากนั้นนำสารละลายที่กลั่นได้ทั้งหมดไปไตเตรตกับสารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐาน จนถึงจุดยุติที่เป็นสีชมพูและสารละลายเป็นสีเทาอมม่วง บันทึกปริมาณสารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐานที่ใช้ไตเตรต นำไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด

วิธีการคำนวณ

ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่าง (ร้อยละ)

$$= \frac{(\text{ml.}H_2SO_{4\ \text{Sample}} - \text{ml. }H_2SO_{4\ \text{Blank}}) \times \text{conc. }H_2SO_4 \times 01.4007}{\text{g.Sample}}$$

เมื่อกำหนดให้

$\text{ml.}H_2SO_{4\ \text{Sample}}$ คือ ปริมาตรสารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐานที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

$\text{ml. }H_2SO_{4\ \text{Blank}}$ คือ ปริมาตรสารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐานที่ใช้ในการไตเตรต Blank (มิลลิลิตร)

$\text{conc. }H_2SO_4$ คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐานที่ใช้ในการไตเตรต (นอร์มอล)

g.Sample คือ น้ำหนักตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ (กรัม)

วิธีการคำนวณ

ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ) = ปริมาณไนโตรเจน(ร้อยละ) x แฟกเตอร์ (ใช้ที่แฟกเตอร์เท่ากับ 6.25)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์หาไขมัน (Folch, 1957)

สารเคมีที่ใช้

1. คลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1
2. น้ำกลั่นบริสุทธิ์

วิธีทำ

ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการบดละเอียดแล้วปริมาณ 5 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลม (Round botton flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมคลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 ปริมาตร 60 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงเพื่อให้เกิดการสกัดอย่างสมบูรณ์ นำมาทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์1 นำของเหลวที่ได้ใส่ลงในฟลาสก์นำกากที่เหลือมาทำการสกัดอีกครั้งด้วย คลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 ทำการกรองแล้วรวมสารละลายที่ได้เข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ร้อยละ 20 ของปริมาณสารละลายที่กรองได้ ผสมให้เข้ากันอย่างทั่วถึง จากนั้นตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้น เก็บสารละลายชั้นล่างใส่ลงในฟลาสก์ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไประเหยแห้งด้วยหม้อควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักสุดท้ายของฟลาสก์ที่ระเหยแห้งแล้ว ทำการคำนวณปริมาณไขมันด้วยสูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณไขมัน(ร้อยละ)} = \frac{(\text{น้ำหนักฟลาสก์หลังอบแห้ง-น้ำหนักฟลาสก์}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

การหาปริมาณคาร์โบไฮเดรต (AOAC, 2003)

คาร์โบไฮเดรตในตัวอย่างอาหารจะรวมถึงกากใยอาหารด้วย (Crude fiber) ซึ่งหาได้จากการนำค่า 100 เปอร์เซ็นต์ลบกับเปอร์เซ็นต์ปริมาณของไขมัน โปรตีน เถ้า และน้ำ จะทำให้ได้ค่าคาร์โบไฮเดรตรวมทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหาร (โดยการคำนวณ)

วิธีการคำนวณ

ร้อยละของคาร์โบไฮเดรต (จากการคำนวณ) = 100 - (ร้อยละของความชื้น + ร้อยละของไขมัน + ร้อยละของโปรตีน + ร้อยละของเถ้า)

การหาค่าพลังงาน (AOAC, 2003)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

คำนวณจากปริมาณคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีนที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต 1 กรัมให้พลังงาน 4 กิโลแคลอรี และ ไขมัน 1 กรัมให้พลังงาน 9 กิโลแคลอรี

วิธีการคำนวณ

ค่าพลังงาน (กิโลแคลอรี/100กรัม) = (ร้อยละของคาร์โบไฮเดรต x 4) + (ร้อยละของไขมัน x 9)+ (ร้อยละของโปรตีน x 4)

การวิเคราะห์หาปริมาณเกลือ (AOAC,2003)

สารเคมีที่ใช้

1. โปแตสเซียมโครเมต ความเข้มข้นร้อยละ 5 เตรียมได้โดยละลายโปแตสเซียมโครเมต 4.2 กรัม และโปแตสเซียมไดโครเมต 0.7 กรัม ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ขวดปรับปริมาตร
2. สารละลายเงินไนเตรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เตรียมโดยละลายเงินไนเตรต 16.988 กรัมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 กรัมในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

วิธีทำ

นำเถ้าที่เหลือจากการวิเคราะห์เถ้า เติมน้ำกลั่นคนให้ทั่ว เทสารละลายเถ้าทั้งหมดใส่ในจานเผาเติมสารละลายโปแตสเซียมโครเมต ความเข้มข้นร้อยละ 5 ลงไป 0.5 มิลลิลิตร เป็นอินดิเคเตอร์ ไตเตรตกับสารละลายเงินไนเตรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนกระทั่งได้สีส้มอ่อนๆ ปรากฏให้เห็นเป็นจุดยุติ คำนวณหาร้อยละของเกลือในตัวอย่าง

1 มิลลิลิตรของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ทำปฏิกิริยาสมมูลพอดีกับเกลือแกงจำนวน 0.005845

วิธีการคำนวณ

เกลือ (ร้อยละ) = ปริมาตรของซิลเวอร์ไนเตรต X 0.5845

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรตตกค้าง และ ไนไตร์ทตกค้าง (AOAC, 2003)

สารเคมีที่ใช้

1. KNO_3 (potassium nitrate)
2. น้ำกลั่นที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อ
3. Ammonium acetate buffer pH 9 ร้อยละ 1

4. Sodium hydroxide 0.5 นอร์มอล
5. $ZnSO_4.7H_2O$ ร้อยละ 12
6. Sulfanilamide (SA) ร้อยละ 0.5
7. Hydrochloric acid (1 ต่อ 1)
8. NEDA (naphthylethylenediamine) ร้อยละ 0.12

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานไนเตรต (NO_3-N) 100 ส่วนในล้านส่วน (Stock standard)

เตรียม stock โดยชั่ง potassium nitrate (KNO_3) ซึ่งผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง และทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นจำนวน 0.1805 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อแล้ว ถ่ายสารมาตรฐานใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร ล้างบีกเกอร์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อแล้ว รวมน้ำที่ล้างใส่ในขวดปรับปริมาตรใบเดิมทำซ้ำจนบีกเกอร์สะอาด ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการสเตอร์ไรด์แล้ว ถ่ายสารละลายมาตรฐานใส่ขวดที่ฆ่าเชื้อแล้วและมีจุกปิดสนิท (เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิไม่เกิน 10 องศาเซลเซียส ได้นาน 6 เดือน)

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐานไนไตรต์ (NO_2-N) 0.2 ส่วนในล้านส่วน (เตรียมก่อนการใช้)

ปิเปตสารละลายมาตรฐานในข้อที่ 1 มาจำนวน 200 ไมโครลิตร ด้วย Micropipette ใส่ใน ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มี Ammonium acetate buffer pH 9 ร้อยละ 1 บรรจุอยู่แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย Ammonium acetate buffer pH 9 ร้อยละ 1

3. การเตรียมสารละลายมาตรฐานไนเตรต (NO_3-N) 1 ppm (เตรียมใหม่ๆก่อนการใช้)

ปิเปตสารละลายมาตรฐานในข้อที่ 1 มาจำนวน 500 ไมโครลิตร ด้วยไมโครปิเปต ใส่ในขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มี Ammonium acetate buffer pH 9 ร้อยละ 1 บรรจุอยู่แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วย Ammonium acetate buffer pH 9 ร้อยละ 1

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างจำนวน 10 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียด 0.01 กรัม ใส่ลงบีกเกอร์ บันทึกน้ำหนักที่แน่นอนเพื่อทำการวิเคราะห์ (สำหรับ Blank ใช้น้ำกลั่นแทน)
2. เติมน้ำกลั่นอุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส จำนวน 50 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างใช้แท่งแก้วคน ถ่ายใส่ในขวดปรับปริมาตร ขนาด 200 มิลลิลิตร
3. ล้างบีกเกอร์ด้วยน้ำอุ่นหลายๆครั้ง รวมน้ำล้างลงในขวดปรับปริมาตรไม่ควรให้ปริมาตรเกิน 150 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. เติม Sodium hydroxide 0.5 นอร์มอล จำนวน 10 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน
5. เติม $ZnSO_4.7H_2O$ ร้อยละ 12 จำนวน 10 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน
6. นำขวดปรับปริมาตรที่มีตัวอย่าง ไปแช่ในหม้อควบคุมอุณหภูมิ ที่มีอุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เขย่าเป็นบางครั้ง
7. นำขวดปรับปริมาตรที่มีตัวอย่าง ไปแช่ในน้ำเย็น ให้สารละลายเย็นจัดเพื่อให้ไขมันจับเป็นก้อนง่ายต่อการกรอง แล้วเติม Ammonium acetate buffer pH 9 ร้อยละ 10 จำนวน 20 มิลลิลิตร
8. ปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อให้ตัวอย่างตกตะกอน
9. กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บสารละลายที่กรองได้ในระยะแรกประมาณ 20 มิลลิลิตร
10. สารละลายที่กรองได้เรียกว่า Test solution หรือ Filtrate ใช้สำหรับวิเคราะห์ไนเตรตและไนไตรต์ต่อไป (สารละลายนี้ไม่ควรเก็บข้ามคืน หากจำเป็นอาจเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ได้ไม่เกิน 1 คืน)

การหาปริมาณโซเดียมไนไตรต์

1. ปิเปตสารละลาย Test solution มาจำนวน 20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร (ชุด A) หาก Test solution มีสีให้ปิเปตสารละลาย Test solution มาจำนวน 20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร (ชุด B)
2. เติม Sulfanilamide (SA) ร้อยละ 0.5 จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในชุด A เขย่าให้เข้ากัน สำหรับชุด B (หากมี) ให้เติม Hydrochloric acid (1 ต่อ 1) จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
3. เติม NEDA (Naphthylethylenediamine) ร้อยละ 0.12 ลงไปทั้งสองชุด เขย่าให้เข้ากัน
4. ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน
5. ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที (ความเข้มของสีจะคงที่หลังเกิดปฏิกิริยา 10 นาที ถึง 2 ชั่วโมง)
6. อ่านความเข้มของสีด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้น้ำเป็นตัวอย่างอ้างอิง

Aa	=	Abs. of sample ชุด A
Ab	=	Abs. of method blank
Ac	=	Abs. of sample ชุด B (กรณี Test solution ไม่มีสีไม่ต้องทำชุด B)

การเตรียมกราฟมาตรฐานของไนไตรต์ (ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานจำนวน 0, 2, 5, 10, 15 และ 20 มิลลิลิตรใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 6 ใบ ตามลำดับ
2. เติม Ammonium acetate buffer pH 9 ร้อยละ 1 ลงในขวดปรับปริมาตรแต่ละใบ เพื่อปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตร
3. เติม Sulfanilamide (SA) ร้อยละ 0.5 จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรทุกใบ เขย่าให้เข้ากัน
4. เติม NEDA (Naphthylethylenediamine) ร้อยละ 0.12 จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรทุกใบ เขย่าให้เข้ากัน
5. ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน
6. ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที (ความเข้มของสีจะคงที่หลังเกิดปฏิกิริยา 10 นาที ถึง 2 ชั่วโมง)
7. อ่านความเข้มของสีด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้น้ำเป็นตัวอย่างอ้างอิง
7. นำ Absorbance ที่ได้หักลบ Blank (0 ไมโครกรัม สารละลายมาตรฐานไนไตรต์) แล้วนำไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง Abs. กับ ปริมาณของสารละลายมาตรฐานไนไตรต์

การหาปริมาณโซเดียมไนเตรต

1. ปรับอัตราการไหลของสารละลายในคอลัมน์แคดเมียม โดยเติม Ammonium acetate buffer pH 9 ร้อยละ 1 ลงในคอลัมน์แคดเมียมทางส่วนบนของ Reservior ให้เกินขีดบอกปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วปรับอัตราการไหลของสารละลายให้ได้ 3-4 มิลลิลิตรต่อ นาที ที่ระดับสารละลาย 25 มิลลิลิตร เมื่อปรับอัตราการไหลได้ตามที่ต้องการแล้ว ปล่อยให้สารละลายไหลไปจนหมด
2. ปิเปตสารละลาย Test solution มาจำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ใน Reservior ของคอลัมน์รองรับสารละลายที่ออกจากปลายคอลัมน์ด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร
3. เมื่อสารละลายในReservior ของคอลัมน์ไหลออกจนหยดสุดท้ายให้เติม Ammonium acetate buffer pH 9 ร้อยละ 1 จำนวน 10 มิลลิลิตร แล้วปล่อยให้ไหลออกจนหมด ทำซ้ำเช่นนี้ 4 ครั้ง แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นสารละลายที่ได้เรียกว่า Test portion for nitrate
4. ปิเปตสารละลาย Test portion for nitrate มาจำนวน 20 มิลลิลิตร ใส่ในใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร (ชุด A) หาก Test solution มีสีให้ปิเปตสารละลาย Test solution มาจำนวน 20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร (ชุด B)
3. เติม Sulfanilamide (SA) ร้อยละ 0.5 จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในชุด A เขย่าให้เข้ากัน สำหรับชุด B (หากมี) ให้เติม Hydrochloric acid (1 ต่อ 1) จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. เติม NEDA (Naphthylethylenediamine) ร้อยละ 0.12 จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงไปทั้งสองชุดเขย่าให้เข้ากัน
5. ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน
6. ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที (ความเข้มของสีจะคงที่หลังเกิดปฏิกิริยา 10 นาที ถึง 2 ชั่วโมง)
8. อ่านความเข้มของสีด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้น้ำเป็นตัวอย่างอ้างอิง

Aa = Abs. of sample ชุด A

Ab = Abs. of method blank

Ac = Abs. of sample ชุด B (กรณี Test solution ไม่มีสีไม่ต้องทำชุด B)

การเตรียมกราฟมาตรฐานของไนเตรต (ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์)

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานไนเตรตที่ผ่านคอลัมน์แคดเมียมแล้วจำนวน 0, 2, 5, 10, 15 และ 20 มิลลิลิตรใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 5 ใบ ตามลำดับ
2. เติมAmmonium acetate buffer pH 9 ร้อยละ 1 ลงในขวดปรับปริมาตรแต่ละใบ เพื่อปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตร
3. เติมSulfanilamide (SA) ร้อยละ 0.5 จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรทุกใบ เขย่าให้เข้ากัน
4. เติม NEDA (Naphthylethylenediamine) ร้อยละ 0.12 จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรทุกใบ เขย่าให้เข้ากัน
5. ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน
6. ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที (ความเข้มของสีจะคงที่หลังเกิดปฏิกิริยา 10 นาที ถึง 2 ชั่วโมง)
7. อ่านความเข้มของสีด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ Wavelength 540 นาโนเมตร โดยใช้น้ำเป็น reference
8. นำ Absorbance ที่ได้หักลบ Blank (0 ไมโครกรัม สารละลายมาตรฐานไนเตรต) แล้วนำไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง Absorbance กับ ปริมาณของสารละลายมาตรฐานไนเตรต

การคำนวณ

โซเดียมไนไตรต์

$$NaNO_2 \text{ (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)} = \frac{(X_2) \times 49.286}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

โซเดียมไนเตรต

$$NaNO_3 \text{ (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)} = \frac{(X_1) - (X_2) \text{ X } 6.07}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

เมื่อกำหนดให้

X_1 คือ ปริมาณไนเตรตที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

X_2 คือ ปริมาณไนไตรต์ที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

การวิเคราะห์หาปริมาณคอเลสเตอรอล (Food Analysis, 2003)

สารเคมีที่ใช้

1. Cholesterol standard solution เตรียม Stock solution เท่ากับ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร DMF (Dimethyformamide) เตรียมสารละลายจาก Standard stock solution ให้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.05 ถึง 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร DMF
2. 5α-cholestane internal standard solutions (No.19505, Applied Science) เตรียม Stock solution เท่ากับ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร Heptane เตรียมจากสารละลาย Internal standard solution จาก Stock solution ให้ได้ 2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร n-heptane
3. n-Hexane
4. Isopropanol
5. Ethanol, absolute
6. Toluene, nanograde
7. Hexamethylidisilane (HMDS)
8. Trimethylchlorsilane (TMCS)
9. Potassium hydroxide ร้อยละ 60 เตรียมจากการละลาย KOH กรัมในน้ำ Deionized 40 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

อุปกรณ์ที่ใช้

1. Centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตรล้างทำความสะอาดด้วยเมทานอลที่ปราศจากน้ำ และทำให้แห้งที่ 110 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 นาที ย้ายใส่โถดูดความชื้นเติมสารละลาย Dimethyldichlorosilane (DMCS) ร้อยละ 10 ที่ใช้ตัวทำละลายเป็น Toluene ลงในหลอดปิดจุกและตั้งทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง เทสารละลายทิ้งและล้างอีกครั้งด้วยเมทานอลที่ปราศจากน้ำ อบแห้งที่ 110 องศา

เซลเซียส ก่อนใช้ หลังการใช้ต้องทำความสะอาดด้วยเมทานอล น้ำ และ เมทานอล ตามลำดับ ทำให้แห้งอีกครั้งที่ 100 องศาเซลเซียส ก่อนการใช้ครั้งต่อไป

2. Gas chromatography ใช้ โlame ionization detector บน Column injection system และเป็น U-shaped glass column ขนาด 2.4 X 4 มิลลิเมตร ที่ pack ด้วย Apiezon L ร้อยละ 0.5 (No.08304, Applied Science) บน Gas-Chrom Q 80-100 mesh (No.02002,Applied Science) สภาวะการควบคุม (Operating Condition) ตั้งดังนี้ Temps (องศาเซลเซียส)-flash heater 275,Detector 275, Column 230, Flow rate (มิลลิลิตร/นาที)-N (ultra high purity grade) ประมาณ 50, Elute Cholesterol ภายใน 9-11 นาที, Flow rate ของ H ประมาณ 35, Flow rate ของอากาศประมาณ 350, Electrometer sensitivity $1X10^{-9}$ amp full-scale Deflection ด้วย Recorder 1 mV

1. Rotary evaporator
2. Water bath
3. Homogenizer

วิธีการ Saponification

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 1-10 กรัมใส่ลงในฟาสค์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเอทานอล 40 มิลลิลิตร ลงไปแล้วทำการเขย่าให้เข้ากัน
2. เติม KOH ร้อยละ 60 จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงไปแล้วทำการเขย่าให้เข้ากัน
3. Reflux ในหม้อควบคุมอุณหภูมิ นาน 30 นาที ด้วย Air condenser เขย่าตลอดเวลา
4. ทิ้งไว้ให้เย็นเป็นเวลา 30 นาที

วิธีการสกัด

1. นำตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนการ Saponification มาในกรวยแยก
2. ล้าง flask ด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรจากนั้นเติม n-Hexane 50 มิลลิลิตรลงในกรวยแยก
3. สกัดส่วนที่เป็น Unsaponification จากชั้นที่อยู่ด้านล่าง แยกไปใส่กรวยแยกอันอื่นแล้วทำการแยกด้วยการเติม n-Hexane 50 มิลลิลิตรลงในกรวยแยกอีกครั้ง
4. รวมส่วนที่ทำการสกัดได้ด้วย Hexane เข้าด้วยกันเขย่าล้างด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร อีก 3 ครั้ง โดยการหมุนวนเบาๆในกรวยแยก
5. กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ที่มี Na_2SO_4 ที่ปราศจากน้ำใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มล
6. ทำการระเหยเฮกเซนจนเกือบแห้ง เติม Isopropanol 2-3 มิลลิลิตร เติมเฮกเซนเล็กน้อยทำการระเหยอีกครั้งจนเกือบแห้ง มิลลิลิตร เติมเฮกเซนเล็กน้อยทำการระเหยอีกครั้งจนแห้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

7. นำมาสกัดด้วยออกซิเจนที่ปราศจากไนโตรเจน และละลายลงใน Dimethyformamide 3 มิลลิลิตร

วิธีการ Derivatization

1. นำสารละลาย Cholesterol Standard แต่ละความเข้มข้นมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนติฟิวส์ขนาด 15 มิลลิลิตร (รักษาหลอดให้แห้งและสะอาด)
2. เติม HADS 0.2 มิลลิลิตร และ TMCS 0.1 มิลลิลิตร ปิดจุกและเขย่าอย่างแรงด้วย Test tube mixer ตั้งทิ้งไว้ 30 วินาที และทิ้งไว้ต่ออีก 30 นาทีโดยไม่รบกวน
3. เติม 5α-cholestane internal standard ลงไป 1 มิลลิลิตร เติมน้ำในแต่ละหลอด 10 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงนาน 1 นาที และปั่นเหวี่ยงนาน 2 นาที
4. นำสารละลายส่วนที่สกัดด้วย Heptane ใส่ลงใน Vial ซึ่งแน่ใจว่าไม่มีน้ำปะปนอยู่

วิธีการ GC analysis

1. ใส่ตัวอย่าง 5 ไมโครกรัม และตัวอย่างมาตรฐานในคอลัมน์ GC โดย Retention time ของ5α-cholestane และcholesterol คือ 5 และ 10 นาที ตามลำดับ
   ก) คำนวณหาพื้นที่ของ Peak โดยใช้ความสูงและความกว้าง นำไปหา Standard response ratio (SRR)โดยหาพื้นที่ของ Cholesterol ด้วยพื้นที่ของ Peak internal standard และหาค่าเฉลี่ยของ Duplicate ทำการ Plot กราฟ Standard response ratio (แกนY) เทียบกับความเข้มข้นของ Cholesterol (แกนX) ซึ่ง Standard response ratio ควรจะมีช่วง คลอบคลุมปริมาณของ Cholesterol ในตัวอย่าง

$$\text{SRR} = \frac{\text{พื้นที่ของ cholesterol}}{\text{พื้นที่ของ peak internal standard}}$$

$$\text{ความชันของกราฟ (K)} = \frac{\text{SRR}}{\text{ความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลมาตรฐาน}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณปริมาณคอเลสเตอรอล (มิลลิกรัม/ 100 กรัม)

$$= \frac{\text{มิลลิกรัม/ มิลลิลิตรคอเลสเตอรอลในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานXระดับความเข้มข้นX100}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

การวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียม (Atomic Absorption Spectrometer)

สารเคมีที่ใช้

1. กรดไนตริกร้อยละ 65
2. กรดซัลฟูริกร้อยละ 95-97
3. กรดเปอร์คลอริกร้อยละ 70
4. น้ำดีไอออไนซ์

วิธีทำ

1. ชั่งตัวอย่างจำนวน 1 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ใส่กรดไนตริกร้อยละ 65 จำนวน 10 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระจกนาฬิกา นำไปต้มจนหมดควันสีน้ำตาลแล้วปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น
2. ใส่กรดซัลฟูริกร้อยละ 95-97 และกรดเปอร์คลอริกร้อยละ70 อย่างละ 10 มิลลิลิตร ต้มจนสารละลายใสแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
3. ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำดีไอออไนซ์
4. นำสารละลายที่ได้ไปทำการวัดปริมาณแคลเซียมด้วยเครื่อง Atomic absorption.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์

การหาปริมาณเชื้อทั้งหมด (Total Plate Count) ตามวิธีการของ AOAC,2002

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

- สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (Bacto® Peptone, Difco Laboratory, U.S.A.)

ชั่งเปปโตน 0.1 กรัมในน้ำกลั่น 100 กรัม เตรียมในขวด Duran ขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวนขวดละ 90 มิลลิลิตร และใส่หลอดเลี้ยงเชื้อจำนวน 9 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Gallenkamp, England) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15 นาที

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (Bacto® Plate Count Agar, Difco Laboratory, U.S.A.)

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA 23.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาณ 1 ลิตร ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Gallenkamp, England) ที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.0±0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

วิธีทำ

1. สุ่มเก็บตัวอย่างไส้กรอกจำนวน 10 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) ใส่ในถุงสำหรับตีป่น (Stomacher bag) เติมสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องตีป่นเป็นเวลา 2 นาที จะได้ตัวอย่างเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1}
2. ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ที่ฆ่าเชื้อแล้วเจือจางตัวอย่างอาหารให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1}-10^{-3} ด้วยสารละลายเปปโตนหลอดละ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
3. ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ดูดสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่างๆ ตั้งแต่ 10^{-1}-10^{-3} จำนวนจานละ 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ระดับความ เจือจางละ 2 จาน โดยเริ่มดูดจากความเข้มข้นต่ำสุดก่อน
4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่หลอมเหลวแล้วและมีอุณหภูมิ 45-46 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15-20 มิลลิลิตร ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับตัวอย่างโดยการหมุนวนซ้าย ขวา บน และล่าง อย่างละ 5 รอบ วางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว คว่ำจานเพาะเชื้อลง
5. บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อ (Gallenkamp, England) ที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 48 ± 3 ชั่วโมง
6. ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีเชื้ออยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อทั้ง 2 จาน รายงานผลการตรวจนับว่ามีจำนวน Mesophilic aerobic bacteria ในรูปจำนวนโคโลนีต่อกรัมอาหาร คำนวณโดยใช้สูตร ดังนี้

$$\text{ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (โคโลนี/กรัม)} = \frac{\sum C}{}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

$$V\ (n_1 + 0.1n_2)\ d$$

ΣC คือ ผลรวมโคโลนีที่นับได้บนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนี 30-300 โคโลนีทั้งหมด

V คือ ปริมาตรของ Inoculums

n_1 คือ จำนวนจานเลี้ยงเชื้อในความเจือจางแรกที่สามารถนับได้

n_2 คือ จำนวนจานเลี้ยงเชื้อในความเจือจางที่สองที่สามารถนับได้

d คือ ความเจือจางแรกที่สามารถนับได้

การหาปริมาณยีสต์และรา (Yeast and Mold) ตามวิธีการของ AOAC, 2002

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเลี้ยง

- สารละลายบัพเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (Bacto® Peptone, Difco Laboratory, U.S.A.)

ชั่งเปปโตน 0.1 กรัมในน้ำกลั่น 100 กรัม เตรียมในขวด Duran ขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวนขวดละ 90 มิลลิลิตร และใส่หลอดเลี้ยงเชื้อจำนวน 9 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วย หม้อนึ่งความดันไอ (Gallenkamp, England) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15 นาที

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (Bacto® Plate Count Agar, Difco Laboratory, U.S.A.)

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาณ 1 ลิตร ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Gallenkamp, England) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15 นาที ปรับอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าความเป็นกรด - ด่างเท่ากับ 3.5 โดยการใส่สารละลายกรดตาร์ตาริกความเข้มข้นร้อยละ 10 ลงไป (อาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตรใช้สารละลายกรดตาร์ตาริก 1.9 มิลลิลิตร)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีทำ

1. สุ่มเก็บตัวอย่างไส้กรอกจำนวน 10 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) ใส่ในถุงสำหรับตีป่น (Stomach bag) เติมสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องตีป่นเป็นเวลา 2 นาที จะได้ความเข้มข้น 10^{-1}
2. เจือจางตัวอย่างอาหารให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1}-10^{-3} ด้วยสารละลายเปปโตนหลอดละ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3. ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ดูดสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่างๆ ตั้งแต่ 10^{-1}-10^{-3} จำนวนจานละ 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ระดับความ เจือจางละ 2 จาน โดยเริ่มดูดจากความเข้มข้นต่ำสุดก่อน
4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่หลอมเหลวแล้วและมีอุณหภูมิ 45-46 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15-20 มิลลิลิตร ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับตัวอย่างโดยการหมุนวนซ้าย ขวา บน และล่าง อย่างละ 5 รอบ วางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว คว่ำจานเพาะเชื้อลง
5. บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อ (Gallenkamp, England) ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 72±3 ชั่วโมง
6. ตรวจนับจำนวนโคโลนีเช่นเดียวกับวิธี Total Plate Count

การหาโคลีฟอร์มและอี.โคไล (Coilform and E. coil) โดยวิธี MPN (Most Probable Number Method) ตามวิธีของ AOAC, 2003

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

- สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (Bacto® Peptone, Difco Laboratory, U.S.A.)

ชั่งเปปโตน 0.1 กรัมในน้ำกลั่น 100 กรัม เตรียมในขวด Duran ขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวนขวดละ 90 มิลลิลิตร และใส่หลอดเลี้ยงเชื้อจำนวน 9 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Gallenkamp, England) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15 นาที

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptose Lauryl Sulfate Broth (LSB) (Bacto® Tryptose Lauryl Sulfate Broth , Difco Laboratory, U.S.A.)

ชั่งอาหารTryptose Lauryl Sulfate Broth 35.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาณ 1 ลิตร ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองจำนวน 10 มิลลิลิตร แล้วจึงใส่หลอดดักแก๊สลงไป นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Gallenkamp, England) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15 นาที

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLBB) (Bacto® Brilliant Green Lactose Bile Broth , Difco Laboratory, U.S.A.)

ชั่งอาหาร Brilliant Green Lactose Bile Broth จำนวน 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาณ 1 ลิตร ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองจำนวน 10 มิลลิลิตร แล้วจึงใส่หลอดดักแก๊สลงไป นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Gallenkamp, England) ที่อุณหภูมิ 121 องศา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เซลเซียส ใช้เวลา 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จะมีความเป็นกรด - ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.0±0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue agar (EMB) (Bacteriological, HiMedia Laboratories Limited, India)

ชั่งอาหาร Eosin methylene blue agar จำนวน 37.5 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นปริมาณ 1 ลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Gallenkamp, England) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15 นาที ก่อนนำมาใช้ต้องนำมาต้มให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลาย

- สารละลาย Tryptone จำนวน 1.5 กรัม และ NaCl จำนวน 0.5 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นจำนวน 100 กรัม บรรจุในหลอดเลี้ยงเชื้อหลอดละ 5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Gallenkamp, England) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15 นาที ความเป็นกรด - ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.2

วิธีทำ

การตรวจแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโคลีฟอร์ม

1. ใช้กรรไกรปลอดเชื้อตัดตัวอย่างไส้กรอกจำนวน 10 กรัม เติมสารละลายเปปโตนจำนวน 90 มิลลิลิตร ในถุงสำหรับตีป่น (Stomacher bag) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องตีป่นใช้เวลา 2 นาที จะได้ความเข้มข้น 10^{-1}
2. เจือจางตัวอย่างอาหารให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-3} ด้วยสารละลายเปปโตนหลอดละ 9 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน
3. ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรที่ฆ่าเชื้อแล้ว ดูดสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่างๆ ตั้งแต่ 10^{-1}-10^{-3} จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร LSB จำนวน 10 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 5 หลอด รวมเป็น 15 หลอด
4. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 48 ชั่วโมง หากหลอดเลี้ยงเชื้อมีแก๊สเกิดขึ้น (สังเกตจากหลอด Durham หรือหลอดดักแก๊ส) แสดงว่าผลเป็นบวก ซึ่งคาดว่าจะมีโคลีฟอร์มเจริญในตัวอย่างไส้กรอก ให้ทำการยืนยันผลต่อไป ถ้าไม่พบว่ามีแก๊สเกิดขึ้นในหลอดทดลองใดเลยแสดงว่าผลเป็นลบ ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดโคลิฟอร์มอยู่ในตัวอย่างนั้น

การยืนยันโคลีฟอร์ม

1. ใช้ห่วง (Loop) เขี่ยเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อที่ให้ปฏิกิริยาเป็นบวกจากการทดสอบแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโคลีฟอร์ม ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB บ่มที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 18-24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ตรวจหาโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของโคลิฟอร์ม โดยโคโลนีของโคลิฟอร์มจะมีสีดำหรือสีดำตรงกลางล้อมรอบด้วยบริเวณโปร่งใสไม่มีสี โคลิฟอร์มบางโคโลนีมีลักษณะนูนเปียกเยิ้ม (Mucoid)
3. บันทึกจำนวนหลอดอาหารแต่ละชุดที่มีเชื้อจุลินทรีย์โคลิฟอร์มที่ได้รับการยืนยันแล้ว

การตรวจแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น E. coil

การยืนยัน E.coil

1. ใช้ห่วง(loop) เขี่ยเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อที่ให้ปฏิกิริยาเป็นบวกจากการทดสอบแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น E.coil ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB บ่มที่อุณหภูมิ 37 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 18-24 ชั่วโมง
2. เลือกโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของ E. coil บนอาหาร EMB ซึ่งจะมีลักษณะโคโลนี สีน้ำเงินอมดำตรงกลาง และมีสีเลื่อมมันอมเขียวสะท้อนแสงซึ่งบางครั้งสีเลื่อมมันอาจ ไม่ปรากฏ
3. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อครั้งละ 1 โคโลนีลงใน Tryptone water บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 44.5 $\pm$ 0.5 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 24-48 ชั่วโมง
4. เขี่ยเชื้อ E. coil มาตรฐานในหลอด Tryptone water เพื่อเป็นตัวอย่างเปรียบเทียบ
5. ทำการทดสอบ Indole test โดยการเติม Kovac's reagent 0.2-0.3 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดอาหาร สังเกตการเกิดผลบวก คือ จะเกิดชั้นสีแดงขึ้นบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดที่มีอินโดลเกิดขึ้นแสดงว่าเป็นเชื้อ E. coil จากนั้นบันทึกจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก
6. คำนวณหาปริมาณของ E. coil ตามตารางแมคคราดี (เรณู, 2543) รายงานผลเป็น MPN/กรัม
7. ทำการทดสอบผลเพิ่มเติมเกี่ยวกับ Coilform และ E. coil โดยการทดสอบเมทิลเรด (Methy red) โวเกส-พรอสเกาเออร์ (Voges-Proskauer) และซิเตรต (Citrate test) โดยการทำ MR-VP medium บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 48 $\pm$ 2 ชั่วโมงประเมินผลดังตารางที่ ค.1
   - ทดสอบ methyl red test โดยการหยด methyl red solution จำนวน 5 หยด ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากการบ่มเชื้อแล้ว 48 ชั่วโมง ถ้าให้ผลบวกอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีแดง หากผลเป็นลบอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง
   - ทดสอบ Voges Proskaur test การเกิด acethylmethylcarbinol โดยการปิเปตเชื้อ 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดเปล่า ขนาด 13 x 100 มิลลิลิตร ที่ฆ่าเชื้อแล้ว (ทำโดย Aseptically condition) เติมสารละลายแอลฟาแนปทอล (α-naphthol) ความเข้มข้นร้อยละ 5 จำนวน 0.6 มิลลิลิตร สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 จำนวน 0.2 มิลลิลิตร และผง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ของ creatine ลงไปเล็กน้อย เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง หากให้ผลบวกจะเกิดสีชมพูของ eosin

- Koser Citrate broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 96 ชั่วโมง (4 วัน) สังเกตการเจริญของเชื้อ ถ้าให้ผลบวกอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นน้ำเงิน
- Lauryl sulfate tryptose broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 48 $\pm$ 2 ชั่วโมง สังเกตการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ
- ย้อมสี Gram stain ให้ย้อมสีหลังจากที่บ่มเชื้อใน PCA-agar slant ใช้เวลา 18 ชั่วโมง
- จัดแบ่งกลุ่ม (Classification) ตามคุณสมบัติเชื้อทางชีวเคมีดังตารางที่ ค.1

ตารางที่ ค.1 แสดงคุณสมบัติของเชื้อต่างๆในการทดสอบ IMVIC

	Indole	Methy Red	Voges-Proskauer	Citrate
E.coil	+/-	+	-	-
Citrobacter	-	+	-	-
Klebsiela-Enterobacter	-/+	-	+	+

ที่มา : เรณู (2537)

การหาปริมาณ Salmonella ตามวิธีการของ เรณู, 2543

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

- สารละลายบัพเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1(Bacto® Peptone, Difco Laboratory, U.S.A.)

ชั่งเปปโตน 0.1 กรัมในน้ำกลั่น 100 กรัม เตรียมในขวด Duran ขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวนขวดละ 90 มิลลิลิตร และใส่หลอดเลี้ยงเชื้อจำนวน 9 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Gallenkamp, England) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Tetrathionate Brilliant Green Broth

ชั่ง Tetrathionate Brilliant Green Broth 10.125 กรัม ต้มฆ่าเชื้อและคนให้เข้ากันในน้ำกลั่น 225 มิลลิลิตร เตรียมในขวด Duran ขนาด 250 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว รอให้เย็นแล้ว

จึงเติม Iodine solution ร้อยละ 2 จำนวน 5 มิลลิลิตร และ Brilliant green solution ร้อยละ 1 จำนวน 0.25 มิลลิลิตร

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Selenite Cystine Broth

ชั่ง Selenite Cystine Broth 5.175 กรัม ต้มฆ่าเชื้อและคนให้เข้ากันในน้ำกลั่น 225 มิลลิลิตร เตรียมในขวด Duran ขนาด 250 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Agar

ชั่ง Brilliant Green Agar 5.30 กรัมในน้ำกลั่น 100 กรัม เตรียมในขวด Duran ขนาด 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Gallenkamp, England) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15 นาที

- อาหารเลี้ยงเชื้อ XLD Agar

ชั่ง XLD Agar 5.50 กรัม ต้มฆ่าเชื้อและคนให้เข้ากันในน้ำกลั่น 100 กรัม เตรียมในขวด Duran ขนาด 100 มิลลิลิตร

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Urea Agar
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Triple Sugar Iron Agar

วิธีทำ

1. ใช้กรรไกรปลอดเชื้อตัดตัวอย่างไส้กรอกจำนวน 25 กรัม ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น Selective Enrichment Media (Tetrathionate Brilliant Green Broth หรือ Selenite Cystine Broth) จำนวน 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 24±2 ชั่วโมง
2. ทำการแยกเชื้อดังนี้

- ใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop) ถ่ายเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ Tetrathionate Brilliant Green Broth ลงในผิวหน้าอาหารแห้งของอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Agar และ XLD agar โดยวิธี Streak plate technique จำนวน 2 จาน
- ใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop) ถ่ายเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ Selenite Cystine Broth ลงในผิวหน้าอาหารแห้งของอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Agar และ XLD agar โดยวิธี Streak plate technique จำนวน 2 จาน
- บ่มจานเพาะเชื้อทั้งหมดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 24-48 ชั่วโมง

สังเกตลักษณะของโคโลนี ดังนี้

- อาหารเลี้ยงเชื้อ XLD agar : ลักษณะเฉพาะของโคโลนี Salmonella คือ เป็นโคโลนีสีชมพู-แดงมีสีดำตรงกลางโคโลนีเนื่องจากเชื้อสามารถสร้าง H_2S ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Agar : ลักษณะเฉพาะของโคโลนี Salmonella คือ โคโลนีเป็นสีชมพู-แดง

5. ทำการยืนยันผล โดยการทดสอบทางชีวเคมี

- ถ่ายเชื้อจากตรงกลางโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของ Salmonella ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Triple sugar iron agar โดยการเกลี่ย (Smear) และแทง (Stab) จำนวน 2 หลอด เหลืออีกหนึ่งหลอดไว้เป็นหลอดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 24-48 ชั่วโมง เชื้อ *Salmonella* จะให้ผลดังนี้ ผิวหน้าเอียงของอาหารเป็นสีแดงเนื่องจากปฏิกิริยาเป็น Alkaline slant อาหารบริเวณที่เป็นรอยแทงเป็นสีเหลือง Acid deep อาหารเป็นสีดำเนื่องจากมีการสร้าง H_2S และพบการสร้างแก๊ส
- ถ่ายเชื้อจากตรงกลางโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของ *Salmonella* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Urea agar โดยการเกลี่ย (Smear) จำนวน 2 หลอด เหลืออีกหนึ่งหลอดไว้เป็นหลอดควบคุม โดยเกลี่ยเชื้อลงบนผิวหน้าเอียงของบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 24-48 ชั่วโมง เชื้อ *Salmonella* จะให้ผลดังนี้ คือจะให้ผลลบ (Negative) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากเชื้อ *Salmonella* ไม่สามารถใช้ Urea ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ง
ข้อมูลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Design Expert Version 6.0.2

ใช้โปรแกรม Design Expert ทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติของการทดลองเพื่อหาค่าความแตกต่างของแต่ละสูตรการทดลองและประเมินระดับการใช้ของแต่ละปัจจัยให้ได้ลักษณะของไส้กรอกผสมเนื้อเลาะกระดูกไก่ด้วยเครื่องจักร คอเลสเตอรอลต่ำ ที่มีลักษณะดีที่สุดที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากค่าคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยโปรแกรมการวิเคราะห์จะประมวลผลจากค่าคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสจากข้อมูลที่ได้รับแล้ว ทำนายระดับการใช้แต่ละปัจจัยเพื่อให้ได้ลักษณะตามที่กำหนด ซึ่งในที่นี้คือ ค่าคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสที่เข้าใกล้ค่าทางอุดมคติมากที่สุด หรือ ค่าคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสที่เข้าใกล้ 1.00 มากที่สุดนั่นเอง

ตัวอย่างวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ผลการทดลอง

วางแผนการทดลองในโปรแกรม Design Expert ในส่วนของการวางแผนการทดลองแบบ Mixer design โดยกำหนดจำนวนปัจจัยที่มีผลต่อระบบอิมัลชั่น (เนื้อหมู น้ำมันดอกทานตะวัน และ น้ำแข็ง) กำหนดระดับการใช้ของแต่ละปัจจัยให้เหมาะสมตามข้อมูลที่จะทำการศึกษาในการทดลอง โดยการศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของระบบอิมัลชั่น ซึ่งประกอบด้วย 3 ปัจจัย ได้แก่ เนื้อหมู (500-600 กรัม) น้ำมันดอกทานตะวัน (100-300 กรัม) และ น้ำแข็ง (100-300 กรัม) โดยกำหนดให้อัตราส่วนปัจจัยหลักทั้งหมดรวมกันเป็นร้อยละ 100 (1,000 กรัม) และกำหนดจำนวนสูตรการทดลองที่ต้องการลงในโปรแกรมเพื่อให้โปรแกรมทำการประมวลผลเพื่อเลือกสร้างสูตรที่เหมาะสมสำหรับการใช้ในการทำการทดลองซึ่งจากการกำหนดดังกล่าวโปรแกรมได้กำหนดสูตรที่เหมาะสมสำหรับการใช้ในการทำการทดลองทั้งหมด 6 สูตร ดังนี้

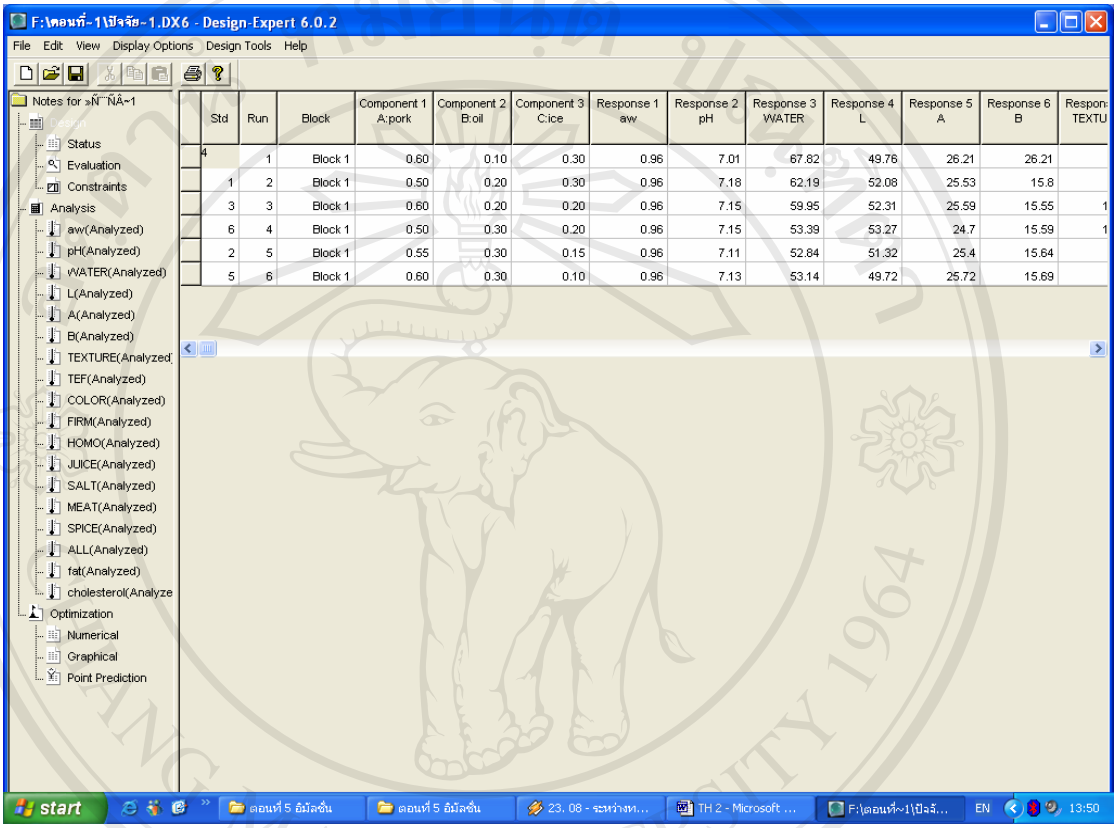
โดยโปรแกรมกำหนดให้

สูตรที่ 1 คือ การใช้เนื้อ 600 กรัม น้ำมันดอกทานตะวัน 100 กรัม น้ำแข็ง 300 กรัม
สูตรที่ 2 คือ การใช้เนื้อ 500 กรัม น้ำมันดอกทานตะวัน 200 กรัม น้ำแข็ง 300 กรัม
สูตรที่ 3 คือ การใช้เนื้อ 600 กรัม น้ำมันดอกทานตะวัน 200 กรัม น้ำแข็ง 200 กรัม
สูตรที่ 4 คือ การใช้เนื้อ 500 กรัม น้ำมันดอกทานตะวัน 300 กรัม น้ำแข็ง 200 กรัม
สูตรที่ 5 คือ การใช้เนื้อ 550 กรัม น้ำมันดอกทานตะวัน 300 กรัม น้ำแข็ง 150 กรัม
สูตรที่ 6 คือ การใช้เนื้อ 600 กรัม น้ำมันดอกทานตะวัน 300 กรัม น้ำแข็ง 100 กรัม

นำค่าที่ได้จากการทดสอบเมื่อทำตามแผนการทดลองตามที่โปรแกรมกำหนดให้ นำผลการวิเคราะห์ผลทางกายภาพ เคมี และประสาทสัมผัสที่ได้ มาเติมลงในโปรแกรมเพื่อวิเคราะห์ผลทาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

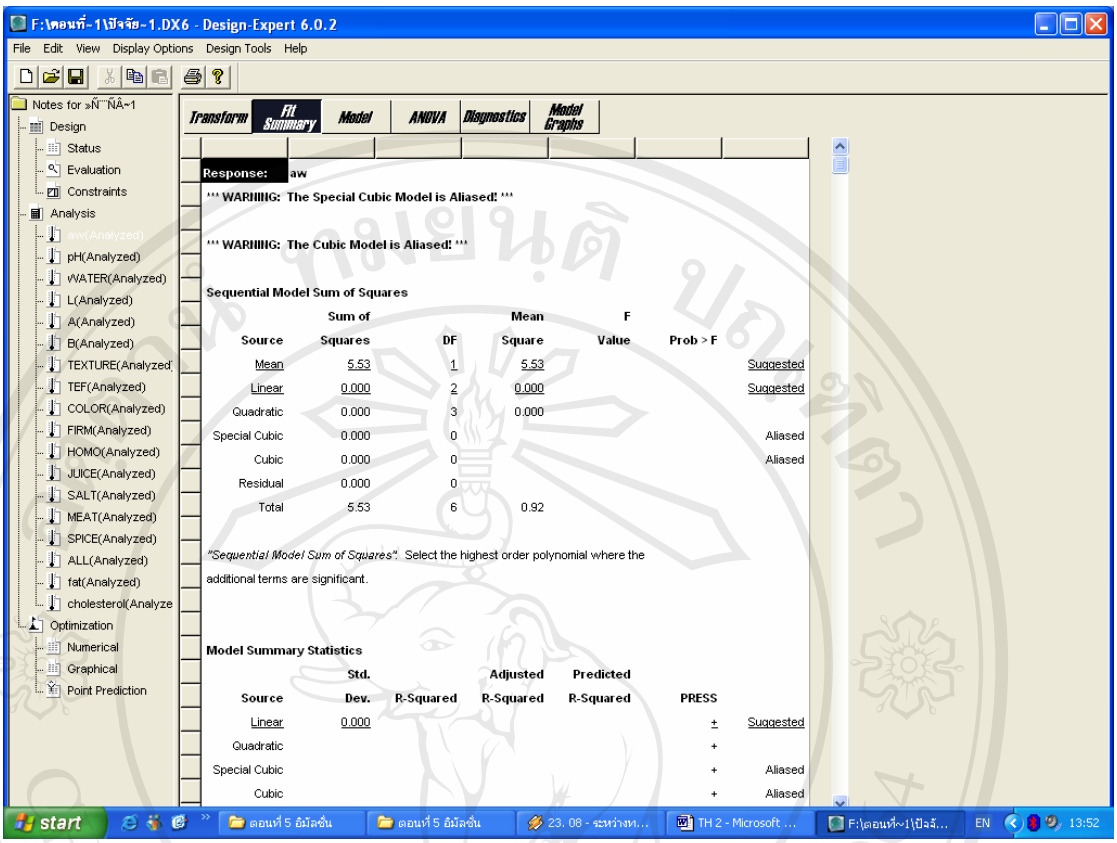
สถิติถึงค่าความแตกต่างของแต่ละสูตรการทดลองและประเมินระดับการใช้ของแต่ละปัจจัยให้ได้ลักษณะของไส้กรอกผสมเนื้อเลาะกระดูกไก่ด้วยเครื่องจักร คอเลสเตอรอลต่ำ ที่มีลักษณะดีที่สุดที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



ภาพที่ ง.1 แสดงการเติมข้อมูลทางกายภาพ เคมี และประสาทสัมผัสในโปรแกรมเมื่อทำวางแผนการทดลองตามที่โปรแกรมกำหนดให้

เลือกการวิเคราะห์ผลการศึกษาระดับการใช้ของแต่ละปัจจัยในส่วน Analysis โดยเลือกสมการการวิเคราะห์ตามที่โปรแกรมส่วนการคัดเลือกสมการที่เหมาะสมตามการแนะนำของโปรแกรม (Suggest) ที่ Fit Summary

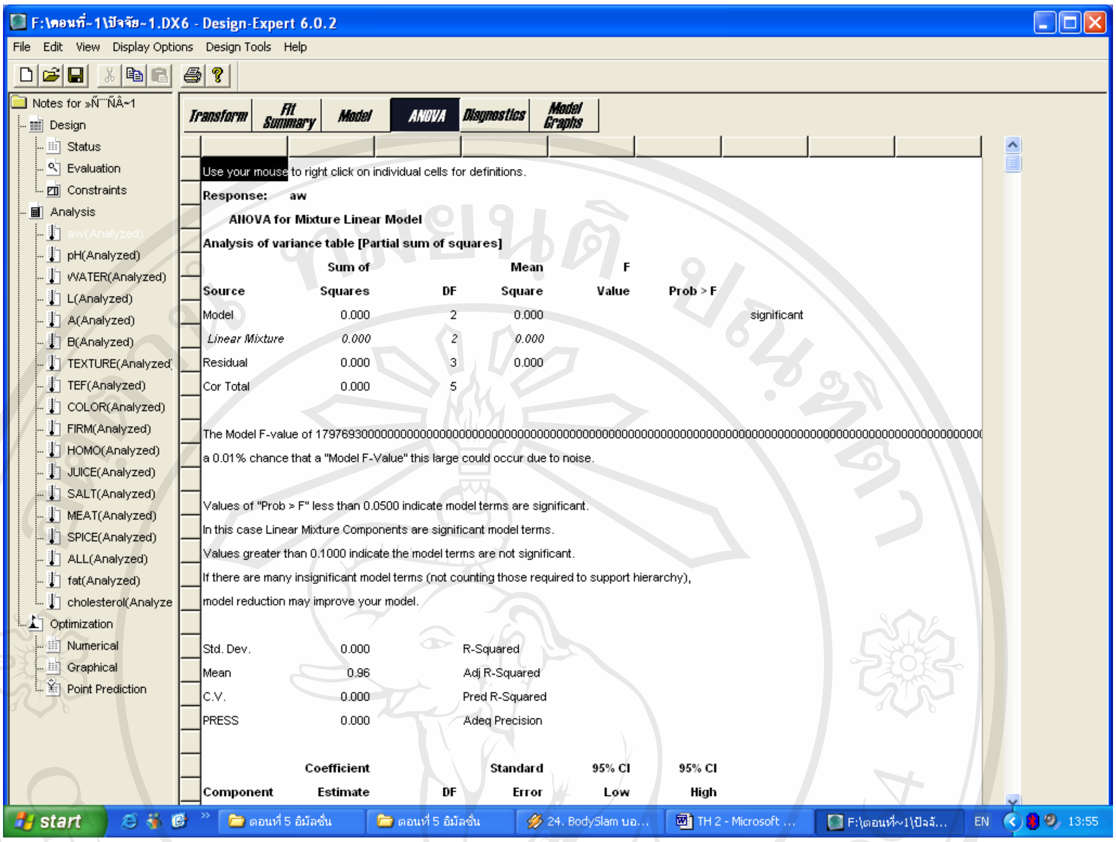
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ ง.2 แสดงการคัดเลือกสมการที่เหมาะสมตามการแนะนำ (Suggest) ของโปรแกรม

เลือกผลการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของแต่ละสูตรการทดลองว่าแต่ละสูตรการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ที่ ANOVA ดังปรากฏในภาพที่ ง.2

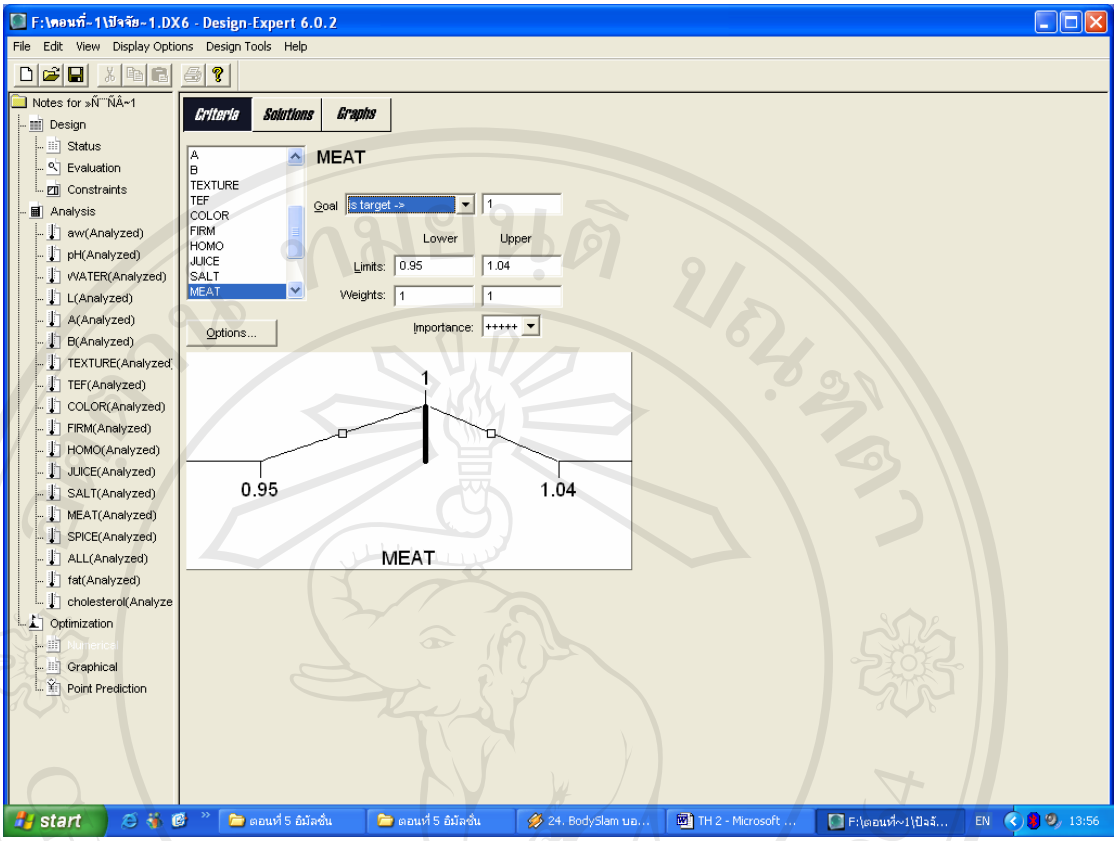
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ ง.3 แสดงการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของแต่ละสูตรการทดลอง

เลือก Numerical ในส่วนของ Opimization เพื่อกำหนดระดับของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการทดลองและค่าคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสที่ควรได้รับจากการวิเคราะห์ ซึ่งในที่นี้คือ ค่าคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสที่เข้าใกล้ค่าทางอุดมคติมากที่สุด หรือ ค่าคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสที่เข้าใกล้ 1.00 มากที่สุดนั่นเอง เช่นในที่นี้ตามตัวอย่างค่าคะแนนทางประสาทสัมผัสมีค่าตั้งแต่ 0.95-1.04 ซึ่งค่าคะแนนทางประสาทสัมผัสที่ดีที่สุดมีค่าเท่ากับ 1.00 จึงกำหนดให้โปรแกรมเลือกค่าที่คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสเท่ากับ 1.00 หรือเป็นค่าในอุดมคตินั่นเอง

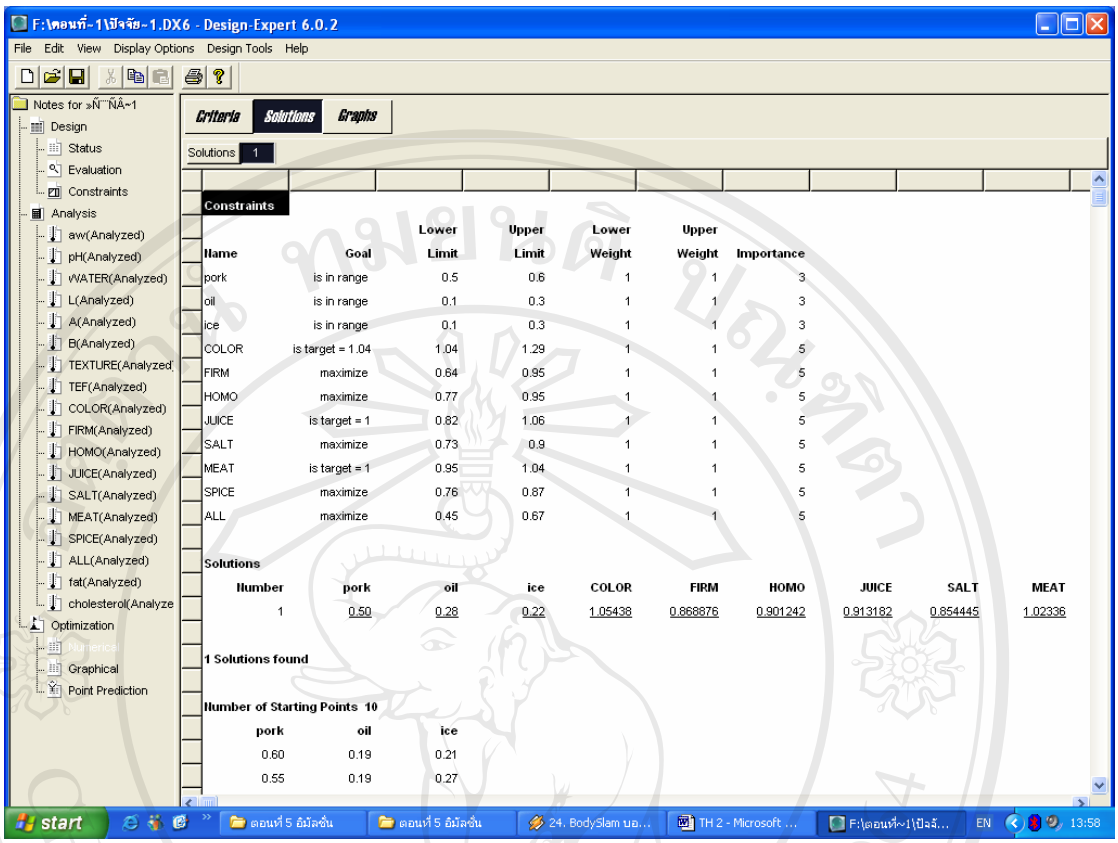
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ ง.4 แสดงการกำหนดระดับของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการทดลองและค่าคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสที่ต้องการได้รับจากการวิเคราะห์

เลือก Solutions เพื่อประเมินระดับการใช้ของแต่ละปัจจัยที่เหมาะสมโดยโปรแกรมการวิเคราะห์จะประมวลผลจากค่าคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสจากข้อมูลที่ได้รับโปรแกรมจะทำการทำนายระดับการใช้แต่ละปัจจัยเพื่อให้ได้ลักษณะตามที่กำหนด หรือเข้าใกล้ค่าทางอุดมคติมากที่สุดนั่นเอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ ง.5 แสดงการทำนายและแนะนำระดับการใช้แต่ละปัจจัยเพื่อให้ได้ลักษณะตามที่กำหนดหรือเข้าใกล้ค่าทางอุดมคติมากที่สุด

การทำนายระดับการใช้แต่ละปัจจัยเพื่อให้ได้ค่าคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสเข้าใกล้ค่าทางอุดมคติมากที่สุดจะทำให้ได้ผลการวิเคราะห์ซึ่งแสดงและแนะนำปริมาณส่วนประกอบในระบบอิมัลชั่น ที่ให้ลักษณะที่ดีที่สุดของไส้กรอกผสมเนื้อเลาะกระดูกไก่ด้วยเครื่องจักรด้วยเครื่องจักร คอเลสเตอรอลต่ำ ดังตารางที่ ง.1 และค่าคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสที่คาดว่าจะได้รับจากการทำนาย ดังตารางที่ ง. 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ ง.1 แสดงปริมาณส่วนประกอบในระบบอิมัลชั่น ที่ให้ลักษณะที่ดีที่สุดของไส้กรอกผสมเนื้อเลาะกระดูกไก่ด้วยเครื่องจักร คอเลสเตอรอลต่ำ

เนื้อ (ร้อยละ)	น้ำมันดอกทานตะวัน (ร้อยละ)	น้ำแข็ง (ร้อยละ)
50.00	28.00	22.00

ดังนั้นจึงทำการกำหนดระดับปริมาณส่วนประกอบในระบบอิมัลชั่น ที่ใช้ในการผลิตไส้กรอกผสมเนื้อเลาะกระดูกไก่ด้วยเครื่องจักร คอเลสเตอรอลต่ำ ที่ระดับเนื้อ ร้อยละ50 (500 กรัม) น้ำมันดอกทานตะวันร้อยละ 28 (280 กรัม) และน้ำแข็ง ร้อยละ 22 (220 กรัม) ซึ่งที่ระดับปริมาณส่วนประกอบในระบบอิมัลชั่น ดังกล่าวจะทำให้สามารถประเมินค่าคะแนนทางประสาทสัมผัสในลักษณะด้านต่างๆ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปดังกล่าวได้ ดังตารางที่ 4.6.5

ตารางที่ ง.2 แสดงค่าสัดส่วนเฉลี่ยที่ดีที่สุดเมื่อทำการแปรผันปริมาณส่วนประกอบในระบบอิมัลชั่นด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ผล Design Expert Version 6.0.2

ลักษณะ	ค่าสัดส่วนเฉลี่ย
สีแดง	1.05
ความแน่นเนื้อ	0.87
ความเป็นเนื้อเดียวกัน	0.90
ความฉ่ำน้ำ	0.91
รสเค็ม	0.85
กลิ่นเนื้อ	1.02
กลิ่นเครื่องเทศ	0.85
การยอมรับรวม	0.62

ระดับปริมาณส่วนประกอบในระบบอิมัลชั่นที่ใช้ในการผลิตไส้กรอกผสมเนื้อเลาะกระดูกไก่ด้วยเครื่องจักร คอเลสเตอรอลต่ำที่ระดับเนื้อ ร้อยละ 50 น้ำมันดอกทานตะวัน ร้อยละ 28 น้ำแข็ง ร้อยละ 22 ซึ่งที่ระดับปริมาณส่วนประกอบในระบบอิมัลชั่นดังกล่าวจะทำให้ได้ ค่าคะแนนทางประสาทสัมผัสในลักษณะด้านสีแดง เท่ากับ 1.05 ความแน่นเนื้อ เท่ากับ 0.87 ความเป็นเนื้อเดียวกัน 0.90 ความฉ่ำน้ำ เท่ากับ 0.91 รสเค็ม เท่ากับ 0.85 กลิ่นเนื้อ เท่ากับ 1.02 กลิ่นเครื่องเทศ เท่ากับ 0.85 และค่าการยอมรับรวม เท่ากับ 0.62 ซึ่งเป็นระดับที่มีคะแนน การยอมรับทางประสาทสัมผัสเข้าใกล้ค่าในอุดมคติโดยรวมทุกลักษณะสูงที่สุด ดังที่ปรากฏในการทดลองตอนที่ 4.6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติการศึกษา

ชื่อ – นามสกุล	นางสาว หทัยรัตน์ ปันคำมูล	
วัน เดือน ปี เกิด	18 มกราคม 2523	
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2538	สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนเรยีนาเซลีวิทยาลัย จังหวัดเชียงใหม่
	พ.ศ. 2541	สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนปรินส์รอยแยลส์วิทยาลัย จังหวัดเชียงใหม่
	พ.ศ. 2545	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ทุนการศึกษา

- ทุนการศึกษาบางส่วนจากโครงการ การใช้เนื้อเลาะกระดูกไก่ด้วยเครื่องจักร น้ำมันพืชและอังคักเพื่อผลิตไส้กรอกที่มีคอเลสเตอรอลต่ำ สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ

ประวัติการทำงาน

- ผู้ช่วยนักวิจัยโครงการ การใช้เนื้อเลาะกระดูกไก่ด้วยเครื่องจักร น้ำมันพืชและอังคัก เพื่อผลิตไส้กรอกที่มีคอเลสเตอรอลต่ำ
- เจ้าหน้าที่ประสานงานโครงการสร้างระบบวินิจฉัยสถานประกอบการ (SHINDAN) สมาคมนักวินิจฉัยสถานประกอบการ กรมส่งเสริมอุตสาหกรรมและศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมที่ 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved