ภาคผนวก ก

ภาพประกอบ

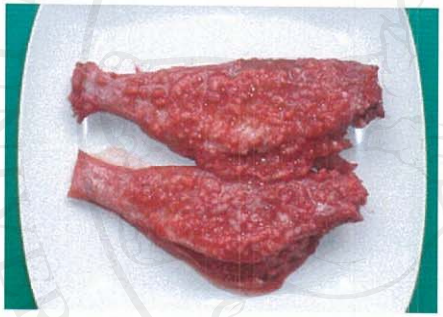
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ ก-1 ปลายี่สก ปลายี่สกเทศ ปลายี่สกทอง (*Probarbus jullieni*)

ภาพ ก-2 ปลาทรายแดง ปลาทรายแดงโม่ง อั้งโกลี้ (*Nemipterus hexodoni*)

ภาพ ก-3 ปลาส้มตัว

ภาพ ก-4 ปลาส้มชิ้น



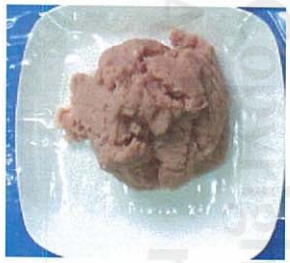
ภาพ ก-5 ปลาแป้งแดงตัว

ภาพ ก-6 ปลาแป้งแดงชิ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สูตรและกระบวนการผลิต
ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมัก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ ก-7 ส่วนผสมหลัก

ภาพ ก-8 ส่วนผสมอื่นๆ

ภาพ ก-9 เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

ภาพ ก-10 ส่วนผสมที่พร้อมบรรจุในไส้คอลลาเจน

ภาพ ก-11 อัดส่วนผสมโดยใช้เครื่องอัดไส้

ภาพ ก-12 ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมัก บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ ก-13 ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมักหลังนึ่ง

ภาพ ก-14 ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมักที่ผลิตโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมเก็บรักษาแบบสุญญากาศในถุงลามิเนต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมัก

ชื่อ..... **วันที่**.....

คำแนะนำ : กรุณาทดสอบจากซ้ายไปขวา แล้วให้คะแนนความชอบในแต่ละคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ ที่ตรงกับความรู้สึกของท่านมากที่สุด โดยกำหนดให้

5 = ชอบมาก **4 = ชอบ** **3 = เฉยๆ** **2 = ไม่ชอบ** **1 = ไม่ชอบมาก**

และกรุณาบ้วนปากก่อนชิมตัวอย่างทุกครั้ง

คุณลักษณะ	รหัสตัวอย่าง					
สี						
กลิ่น						
ความเปรี้ยว						
ความแน่นเนื้อ						
ความชอบโดยรวม						

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

ขอขอบคุณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อ.....วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมัก

กรุณาเขียนตามที่ท่านต้องการอธิบายลักษณะของผลิตภัณฑ์ และลักษณะที่ท่านคิดว่าเป็นลักษณะที่ควรดำนึงถึงในผลิตภัณฑ์ โดยกำหนดเครื่องหมายดังนี้

I คือ ระดับของลักษณะในอุดมคติหรือระดับของลักษณะที่ท่านต้องการจะให้เป็น

X คือ ระดับของลักษณะที่เป็นจริงของตัวอย่างหรือท่านรู้สึกได้จากการชิมตัวอย่าง

คำอธิบายลักษณะของผลิตภัณฑ์

1. ลักษณะปรากฏ

..... -----I----------I------

..... -----I----------I------

..... -----I----------I------

2. กลิ่น-รสชาติ

..... -----I----------I------

..... -----I----------I------

..... -----I----------I----

3. ลักษณะเนื้อสัมผัส

..... -----I----------I------

..... -----I----------I------

..... -----I----------I------

4. การยอมรับโดยรวม

..... -----I----------I------

ข้อเสนอแนะ

.....

ขอขอบคุณที่ได้เสียสละเวลา และให้ความร่วมมือเต็มที่ในการทดสอบครั้งนี้ ข้อมูลที่ได้จากท่านจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมักต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อ.....วันที่.....

ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมัก

กรุณาทดสอบลักษณะต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์ตามที่กำหนดไว้ แล้วทำเครื่องหมาย | (ขีด) พร้อมทั้งระบุหมายเลขของตัวอย่างลงบนเส้นแสดงลักษณะคุณภาพของผลิตภัณฑ์

คำอธิบายลักษณะของผลิตภัณฑ์

1. สีแดง ---l----------l----------l--
อ่อน เข้ม
2. ความเป็นเนื้อเดียวกัน---l----------l----------l---
น้อย มาก
3. กลิ่นหมัก ---l----------l----------l--
น้อย มาก
4. รสเปรี้ยว ---l----------l----------l--
น้อย มาก
5. รสเค็ม ---l----------l----------l--
น้อย มาก
6. ความแน่นเนื้อ ---l----------l----------l--
น้อย มาก
7. ความแข็ง ---l----------l----------l--
แข็งน้อย แข็งมาก
8. การยอมรับโดยรวม ---l----------l--
ไม่ยอมรับ ยอมรับ

ข้อเสนอแนะ

.....
.....
.....

ขอขอบคุณที่ให้ความร่วมมือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์คุณภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

การวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ตามวิธีของ AOAC (2003)

ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมักมาจำนวน 10 กรัม ปั่นผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่างด้วยเครื่อง Microprocessor pH-meter โดยก่อนวัดต้องปรับค่ามาตรฐานในการวัดแต่ละครั้ง (Calibrate) ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานที่มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 4.00 และ 7.00 ตามลำดับ ทำการวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่างของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

การวิเคราะห์ปริมาณกรด ตามวิธีของ AOAC (2003)

การเตรียมสารเคมี

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรโดยใช้ขวดปรับปริมาตร

วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดเทียบกับกรดแลคติค

การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดจะคิดเทียบกับกรดแลคติค ซึ่งเป็นกรดที่มีอยู่มากในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมัก แต่ทั้งนี้ในผลิตภัณฑ์ก็อาจจะมีกรดอื่นๆอยู่ด้วย ซึ่งต้องทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดที่ระเหยไม่ได้ (กรดแลคติคและกรดอะมิโน) และกรดที่ระเหยได้ (กรดอะซิติค) เพิ่มเติม โดยการต้มไล่กรดที่ระเหยได้ออกให้หมดก่อนแล้วจึงทำการวิเคราะห์กรดที่ระเหยไม่ได้ ซึ่งการวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมดทำได้โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมัก 10 กรัม ปั่นผสมกับน้ำกลั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ขวดปรับปริมาตร นำตัวอย่างที่เตรียมได้กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นปิเปตสารละลายส่วนใสที่ได้มา 10 มิลลิลิตรใส่ลงใน ฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ โดยใช้ฟีนอฟธาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณ

$$\text{ร้อยละของกรดทั้งหมด} = \frac{(\text{ml NaOH})(\text{N NaOH})(\text{milliequivalent weight of lacic acid})(100)}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)}}$$

โดยที่

N NaOH = 0.1
milliequivalent weight of lacic acid = 0.09

วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดที่ระเหยได้และระเหยไม่ได้

การวิเคราะห์กรดที่ระเหยไม่ได้ทำได้โดยการชั่งน้ำหนักตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมัก 10 กรัม ปั่นผสมกับน้ำกลั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ขวดปรับปริมาตรนำตัวอย่างที่เตรียมได้กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นนำไปต้มไล่กรดที่ระเหยได้ออกไปจากอาหารให้หมด แล้วนำส่วนที่เหลือจากการระเหยมาละลายน้ำ แล้วนำไปไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ โดยใช้ฟีนอฟธาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

การคำนวณ

ร้อยละของกรดที่ระเหยได้ = ร้อยละของกรดทั้งหมด – ร้อยละของกรดที่ระเหยไม่ได้

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ AOAC (2003)

เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ซึ่งมีทั้งโปรตีนและสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่โปรตีนแต่มีไนโตรเจนรวมอยู่ด้วย

การเตรียมสารเคมี

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 50

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 กรัม ด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

- สารละลายกรดบอริก ความเข้มข้นร้อยละ 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ละลายกรดบอริก 2 กรัม ด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

- สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น
- สารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐาน ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล
- สารละลายเมธิลเรดอินดิเคเตอร์

ละลายเมธิลเรด 0.016 กรัม และบรอมโมครีซอลกรีน 0.083 กรัม ด้วยเอธานอล แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

- คะตะลิสต์ผสม (Catalyst mixture)

ชั่งโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ 96 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟต 3.5 กรัม และซิลิเนียมไดออกไซด์ 0.5 กรัม ผสมให้เข้ากัน

วิธีวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมักที่บดละเอียดแล้วประมาณ 0.5-2.0 กรัม (ต้องทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ใน Kjeldahl digestion flask พร้อมด้วยคะตะลิสต์ผสม 8 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร นำไปย่อยด้วยความร้อนโดยใช้ชุดย่อยโปรตีน (Digestion unit) ทำการย่อยตัวอย่างจนส่วนผสมใส (ประมาณ 2 ชั่วโมง)

2. ตั้งทิ้งไว้จนเย็นและไม่มีไอระเหยของกรด จากนั้นนำ Kjeldahl digestion flask ไปต่อกับชุดกลั่นโปรตีน (Distillation apparatus) นำฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตรที่มีสารละลายกรดบอริก 50 มิลลิลิตร และเมธิลเรด 2-3 หยด เพื่อใช้เป็นอินดิเคเตอร์มารองรับที่ปลาย Condenser โดยให้ปลาย Condenser อยู่ต่ำกว่าระดับของสารละลาย

3. เติมน้ำกลั่นปริมาณ 125 มิลลิลิตร ลงใน Kjeldahl digestion flask จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 75 มิลลิลิตร จากนั้นจึงทำการกลั่นด้วยความร้อน จะได้ของเหลวที่ควบแน่นลงมาทาง Condenser อย่างน้อย 300 มิลลิลิตร ใช้ น้ำกลั่นชะปลาย Condenser ลงมาในฟลาสก์ และนำสารละลายทั้งหมดไปไตเตรตกับสารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐานความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนถึงจุดยุติที่สารละลายเป็นสีส้มแดง

4. บันทึกปริมาตรสารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐานที่ใช้ในการไตเตรต นำไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Crude protein)

5. ทำการวิเคราะห์ Blank โดยวิธีเดียวกับตัวอย่าง แต่ใช้เพียงคะตะลิสต์ผสมกับกรดซัลฟูริกเข้มข้นเท่านั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละของน้ำหนัก)} = \frac{(V_a - V_b) * C * 1.4007}{W}$$

โดยที่

V_a คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

V_b คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ในการไตเตรต Blank (มิลลิลิตร)

C คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก (นอร์มัล)

W คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

ปริมาณโปรตีน (ร้อยละของน้ำหนัก) = ปริมาณไนโตรเจน * Factor

โดย Factor ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมักในการทดลองนี้เท่ากับ 6.25

การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ตามวิธีของ AOAC (2003)

1. นำกระป๋องอลูมิเนียมของเครื่องสกัดไขมัน (Soxhlet extraction apparatus) ไปอบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 100±2 องศาเซลเซียส แล้วปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักของกระป๋องอะลูมิเนียม

2. ชั่งตัวอย่างแห้งผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมักที่ได้ผ่านการหาความชื้นมาเรียบร้อยแล้ว ประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน แล้วห่อลงใน Thimble

3. นำ Thimble ใส่ลงในกระป๋องอลูมิเนียมสำหรับสกัดไขมัน สวมหัวยึดที่เป็นโลหะกับส่วนบนของ Thimble แล้วนำไปติดกับตัวยึด Thimble ที่เป็นแม่เหล็กของเครื่องสกัดไขมัน แล้วสกัดไขมันด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ที่มีจุดเดือด 40-60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 150-200 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการสกัดประมาณ 2 ชั่วโมง

4. ถอด Thimble ที่มีห่อกระดาษกรองออกจากเครื่องสกัดไขมัน แล้วนำกระป๋องอลูมิเนียมที่มีไขมันที่สกัดได้อยู่ภายใน ไปอบที่อุณหภูมิ 100±2 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที หรือจนน้ำหนักคงที่ นำกระป๋องอลูมิเนียมไปทำให้เย็นในโถดูดความชื้น บันทึกน้ำหนักของไขมันที่สกัดได้ แล้วคำนวณหาปริมาณไขมันดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณไขมัน (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง) $= \frac{A * 100}{B}$

โดยที่ A คือ น้ำหนักไขมันที่สกัดได้ (กรัม)

B คือ น้ำหนักตัวอย่างแห้งที่นำมาวิเคราะห์ไขมัน (กรัม)

การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมด (Reducing and total sugar) ตามวิธีของ AOAC (2003)

การเตรียมสารเคมี

- น้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร
- กรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 10
- DNS reagent เตรียมโดยละลาย DNS 10 g ในสารละลาย 200 มิลลิลิตร ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 โมลลาร์ จากนั้นละลายโซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต 300 g ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ผสมเข้าด้วยกัน แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเก็บไว้ในขวดสีชา

การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.25 และ1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่เตรียมไว้ใส่ลงในหลอดทดลองอย่างละ 1 มิลลิลิตร เติม DNS reagent 1 มิลลิลิตรและเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร นำไปต้มใน Water bath 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีแล้วจุ่มลงในน้ำเย็นทันที จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้เป็น 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

วิธีวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์

ชั่งตัวอย่างไส้กรอกปลาหมักมาประมาณ 3 กรัม ใส่ในฟลาสก์ เติมน้ำกลั่นลงไป 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มใน Water bath 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

กรองส่วนผสมที่ต้มแล้วด้วยกระดาษกรอง โดยล้างส่วนที่เหลือบนกระดาษกรองแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ใน Volumetric flask

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดูดสารละลายมา 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ดูดสารละลายมา 1 มิลลิลิตร เติม DNS reagent 1 มิลลิลิตรและเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร นำไปต้มใน Water bath 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีแล้วจุ่มลงในน้ำเย็นทันที จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้เป็น 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า ตามวิธีของ AOAC (2003)

นำถ้วยกระเบื้องเคลือบที่ล้างให้สะอาดแล้ว มาเผาในเตาเผา (muffle furnace) ด้วยอุณหภูมิประมาณ 500 องศาเซลเซียสนานประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งหาน้ำหนักของถ้วยเปล่า จากนั้นชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ใส้กรอกปลาหมักประมาณ 2-3 กรัมใส่ลงในจานเผา นำไปเผาโดยใช้ตะเกียงบุนเซนจนไม่มีควันจากนั้นนำไปเผาต่อในเตาเผา (muffle furnace) ไม่มีควันที่อุณหภูมิ 500 - 550 องศาเซลเซียสจนกระทั่งได้เถ้าสีขาว นำไปทำให้เย็นลงในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักเถ้าแล้วคำนวณหาปริมาณเถ้า ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (กรัม ต่อ 100 กรัมของตัวอย่าง)} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้า (กรัม)} * 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

การวิเคราะห์ปริมาณกากโดยวิธีการย่อยด้วยกรดและด่าง ตามวิธีของ AOAC (2003)

การเตรียมสารเคมี

- สารละลายกรดซัลฟูริก ความเข้มข้นร้อยละ 1.25
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1.25
- เอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 95

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ใส้กรอกปลาหมักที่ผ่านการสกัดไขมันออก และอบเรียบร้อยแล้ว ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน (W1) ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร เติมสารละลายกรดซัลฟูริกความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เข้มข้นร้อยละ 1.25 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ลูกแก้วขนาดเล็กประมาณ 2-3 เม็ด ต้มบนเตาไฟฟ้าโดยปิดปากบีกเกอร์ด้วยกระจกนาฬิกา

2. ทิ้งให้เดือด 30 นาที (ควรปิดปากฟลาสก์ด้วยกระจกนาฬิกา พยายามรักษาปริมาตรสารละลาย ถ้าลดลงให้เติมน้ำร้อนให้ปริมาตรเท่าเดิมโดยทำเครื่องหมายไว้) ขณะต้มควรเขย่า ฟลาสก์เป็นครั้งคราว

3. เตรียมกรวยกรองชนิดพิเศษ (Buchner funnel) โดยใช้แรงสุญญากาศ กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 54 หรือ 531 ค่อย ๆ เทน้ำเดือดลงใส่ลงในกรวยกรอง ปล่อยทิ้งไว้ให้กรวยกรองร้อน

4. นำสารละลายกรดที่ต้มเดือด 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที เทใส่ในกรวยกรองและกรองกากทั้งหมดให้เสร็จภายใน 10 นาที ล้างกากด้วยน้ำร้อนหลาย ๆ ครั้ง จนแน่ใจว่าไม่มีกรดเหลืออยู่ในกาก เทกากที่ล้างแล้วนี้ กลับลงฟลาสก์ใบเดิม

5. ใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1.25 จำนวน 200 มิลลิลิตร ล้างกากออกจากกระดาษกรองใส่ลงฟลาสก์ให้หมด ต้มให้เดือดภายใน 1 นาที และปล่อยให้เดือด 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองโดยใช้แรงสุญญากาศ ให้เสร็จภายใน 10 นาที (เหมือนข้อ 4) ล้างด้วยน้ำร้อนจนแน่ใจว่าไม่มีด่างเหลืออยู่ เทกากที่ล้างแล้วนี้ กลับลงฟลาสก์ใบเดิม

6. นำกากไปล้างด้วยเอธิลแอลกอฮอล์อีก 2 ครั้ง และนำกากที่เหลือทั้งหมดใส่ลงบนกระดาษกรองชนิดปราศจากเถ้า หรือ Porcelain dish (ที่ผ่านการอบและทราบน้ำหนัก) นำไประเหยให้แห้งบนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

7. นำไปอบต่อที่ 100±2 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก (W2)

8. เผาถ้วยกระเบื้องพร้อมกากที่อบเรียบร้อยแล้วในเตาเผาอุณหภูมิ500องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก (W3)

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณกาก (ร้อยละของน้ำหนัก)} = \frac{(W2 - W3)\ (100 - MC - F)}{W1}$$

โดยที่ W1 คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

W2 คือ น้ำหนักถ้วยกระเบื้องและกากหลังจากอบแห้ง (กรัม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

W3 คือ น้ำหนักถ้วยกระเบื้องและกากหลังจากการเผา (กรัม)

MC คือ ปริมาณความชื้นของตัวอย่าง (กรัม)

F คือ ปริมาณไขมันของตัวอย่าง (กรัม)

การวิเคราะห์ใยอาหาร ตามวิธีของ (ลักขณาและนิธิยา, 2544)

สารเคมีที่ใช้

- ปิโตรเลียมอีเทอร์ มีจุดเดือดที่อุณหภูมิ 40 – 60 องศาเซลเซียส
- สารละลายกรดกำมะถันความเข้มข้น 0.1275 โมล่าร์ (0.255 นอร์มัล) เตรียมได้โดยเจือจางกรดกำมะถันเข้มข้นจำนวน 1.25 กรัม ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.313 โมล่าร์ เตรียมได้โดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์มา 1.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะต้องปราศจากโซเดียมคาร์บอเนต
- สารละลายกรดเกลือความเข้มข้นร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เตรียมได้โดยเจือจางกรดเกลือเข้มข้น จำนวน 10 มิลลิลิตร ให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น
- เอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 (ปริมาตรต่อปริมาตร)
- ไดเอทิลอีเทอร์

วิธีการ

1. นำกระดาษกรองชนิดปราศจากเถ้า ไปอบให้แห้งและชั่งหาน้ำหนัก บันทึกน้ำหนักกระดาษกรอง

2. ชั่งอาหารตัวอย่างที่บดละเอียดมา 2.7 – 3.0 กรัม ใส่ในกระดาษกรอง ห่ออาหารตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง นำไปสกัดเอาไขมันออกด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ โดยใช้เครื่องสกัดไขมัน

3. นำกากที่แห้งแล้วไปใส่ในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร เติมสารละลายกรดกำมะถันเข้มข้น 0.1275 โมล่าร์ ลงไป 200 มิลลิลิตร (โดยเติมลงไปประมาณ 30 – 40 มิลลิลิตรก่อน เพื่อช่วยให้กากที่แห้งกระจายตัวได้ดี แล้วจึงเติมให้ครบ 200 มิลลิลิตร)

4. นำไปต้มให้เดือด ภายใน 1 นาที อาจเติมสารป้องกันการเกิดฟอง (เช่น glass bead) ปล่อยทิ้งไว้ให้เดือดนาน 30 นาที ขณะต้มควรปิดปากฟลาสก์ด้วยกระจกนาฬิกา และพยายามรักษาปริมาตรของสารละลายให้คงที่ ถ้าปริมาตรลดให้เติมน้ำร้อนลงไป (ควรทำเครื่องหมายของระดับปริมาตรไว้) ขณะต้มควรเขย่าเป็นครั้งคราว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. เตรียมกรวยชนิดพิเศษ และตัดกระดาษกรองให้พอดีกับกรวยโดยใช้กระดาษเบอร์ 54 หรือ 531 เทน้ำเดือดลงใส่ลงในกรวย ปล่อยทิ้งไว้ให้กรวยร้อน แล้วจึงเปิด suction นำฟลาสก์ที่ใส่สารละลายกรดที่ต้มเดือดครบ 30 นาทีแล้ว ปล่อยตั้งทิ้งไว้ 1 นาที เทใส่ลงในกรวย กรองกากทั้งหมดโดยใช้ suction ให้เสร็จภายใน 10 นาที ล้างกากด้วยน้ำร้อนหลาย ๆ ครั้งจนแน่ใจว่าไม่มีกรดเกลือเหลืออยู่ในกาก

6. เทกากที่ล้างแล้วนี้กลับลงไปในฟลาสก์ใบเดิม ใช้ washed bottle ที่มีสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.313 โมล่าร์ จำนวน 200 มิลลิลิตร ล้างกากออกจากกระดาษกรอง ใส่ลงในฟลาสก์ให้หมด ต้มให้เดือดภายใน 1 นาที และปล่อยให้เดือดนาน 30 นาที

7. นำตัวอย่างที่ต้มเดือดนาน 30 นาทีจากข้อ 6 ไปกรองโดย suction เช่นเดียวกับข้อ 5 ล้างด้วยน้ำร้อนจนแน่ใจว่าไม่มีด่างเหลืออยู่

8. เทกากที่ล้างแล้วนี้กลับลงไปในฟลาสก์ใบเดิม ล้างกากด้วยสารละลายกรดเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 1 ล้างตามด้วยน้ำร้อนอีกจนแน่ใจว่าไม่มีกรดเกลืออยู่

9. นำกากไปล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์อีก 2 ครั้ง และล้างด้วยไดเอทิลอีเทอร์อีก 3 ครั้ง

10. นำกากที่เหลือทั้งหมดใส่ลงบนกระดาษกรองชนิดปราศจากเถ้า ที่ผ่านการอบและทราบน้ำหนักแน่นอน ล้างส่วนที่ติดกระดาษกรองด้วยน้ำร้อนเล็กน้อย นำไประเหยให้แห้งบน boiling-water bath

11. นำไปอบต่อในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ ชั่งหาน้ำหนักของกากที่เหลือ

12. นำกากไปเผาต่อในเตาเผาให้เป็นเถ้าที่อุณหภูมิประมาณ 500 – 550 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นใน desiccator ชั่งหาน้ำหนักเถ้าที่ได้

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเส้นใยในอาหารตัวอย่าง (ร้อยละ)} = \frac{(\text{น้ำหนักแห้งของกาก} - \text{น้ำหนักเถ้า}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการวัดค่าน้ำที่เป็นประโยชน์(a_w) ด้วยเครื่อง (a_w -box, Novasina : AWC 200, Switzerland)

ใส่ตัวอย่างที่ผ่านการบดแล้วในตลับพลาสติกสำหรับใช้กับเครื่องวัดค่าน้ำที่เป็นประโยชน์ แล้วนำไปใส่ในเครื่องวัดค่าน้ำที่เป็นประโยชน์ (a_w -box, Novasina : AWC 200, Switzerland) บันทึกค่าน้ำที่เป็นประโยชน์ที่คงที่ ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการตรวจวัดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย

การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ตามวิธีของ AOAC (2003)

1. บันทึกน้ำหนักของกระป๋องอลูมิเนียม (Moisture can) ที่สะอาด และผ่านการอบเป็นเวลา 20-30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถแก้วดูดความชื้น (Glass desiccator)
2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมักที่บดแล้วประมาณ 3-4 กรัม ลงในกระป๋องอลูมิเนียมที่ผ่านการอบแล้ว เกลี่ยตัวอย่างให้กระจายให้ทั่วกระป๋องอลูมิเนียม เพื่อให้ตัวอย่างแห้งได้เร็ว แล้วนำไปอบในตู้อบไฟฟ้า (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส (ประมาณ 3 ชั่วโมง) จนได้น้ำหนักคงที่
3. นำกระป๋องอลูมิเนียมออกจากตู้อบ และปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้นไม่น้อยกว่า 20 นาที นำไปอบซ้ำหลายๆครั้งจนได้น้ำหนักคงที่ ซึ่งค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันเกิน 0.05 กรัม
4. บันทึกน้ำหนักของกระป๋องอลูมิเนียมและของแข็งที่เหลืออยู่และคำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ, เทียบกับน้ำหนักเปียก)} = \frac{(A-B) \times 100}{C}$$

เมื่อ A = น้ำหนักตัวอย่าง + กระป๋องอลูมิเนียมก่อนอบ (กรัม)
B = น้ำหนักตัวอย่าง + กระป๋องอลูมิเนียมหลังอบ (กรัม)
C = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

การวัดค่าสีในระบบ Hunter Lab (Minolta Camera Co.,Ltd., 2002)

เป็นการวัดสีด้วยเครื่องวัดสี Minolta Camera : Model CR-310 ซึ่งวัดค่าสีในระบบ Hunter Lab โดยค่าสี L เป็นความสว่าง (Lightness) ค่าสี a เป็นค่าสีแดงและเขียว (Redness/Greeness) และค่าสี b เป็นค่าสีเหลืองและน้ำเงิน (Yellowness/Blueness)

เมื่อ L คือ ค่าความสว่าง มีค่าอยู่ในช่วง 0 ถึง 100
a คือ ค่าสีแดง เมื่อ a มีค่าบวก เป็นสีแดง
เมื่อ a มีค่าลบ เป็นสีเขียว
b คือ ค่าสีเขียว เมื่อ b มีค่าบวก เป็นสีเหลือง
เมื่อ b มีค่าลบ เป็นสีน้ำเงิน

ก่อนการวัดค่าสีทุกครั้งต้องทำการปรับมาตรฐานเครื่อง (Calibration) โดยใช้แผ่นสีขาวมาตรฐาน (White blank ; L = 97.67, a = -0.18 และ b = 1.84) แล้วจึงทำการวัดสีของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมัก โดยนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมักที่ผ่านการบดให้ละเอียดแล้วใส่ลงในภาชนะใส (Petri dish) แล้วรองด้วยกระดาษสีขาว ทำการวัดทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

การวัดลักษณะเนื้อสัมผัส (ค่าแรงเฉือน หรือ Shear force) ด้วยเครื่อง Instron (Series 5565) (Instron Corporation, 1993)

เป็นการวัดลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหารโดยใช้ค่าแรงเฉือน หรือ Shear force (นิวตัน) ด้วยเครื่อง Instron series 5565 ชนิดของใบมีดที่ใช้ คือ Warner Bratzler Meat Shear-Compression (2830-013) น้ำหนัก Load cell เท่ากับ 5 กิโลกรัม ความเร็วของ Crosshead เท่ากับ 200 มิลลิเมตรต่อนาที ระยะทางในการเคลื่อนที่ลงทั้งหมดเท่ากับ 5 เซนติเมตร และมีแรงกระทบกลับร้อยละ 60

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ทำการทดสอบเป็นผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมักที่ผ่านการทำให้สุกด้วยการอบที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที แล้วหั่นให้ขนาดของตัวอย่างทั้งหมดมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความหนา ประมาณ 1 เซนติเมตร และมีขนาดเท่าๆกัน ตามที่กำหนดไว้ ในขั้นตอนการวัดจะใช้ใบมีด เฉือนลงมาบนพื้นที่หน้าตัดของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมัก ที่มีขนาดที่ใกล้เคียงกันมากที่สุด โดยจะถือเอาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของไส้เทียมที่มีมาตรฐาน (30 มิลลิเมตร) เป็นตัวกำหนด และก่อนวัดทุกครั้งต้องทำการปรับมาตรฐานเครื่อง (Calibration) และเพื่อป้องกันความคลาดเคลื่อนของผลการทดลองอันเนื่องจากลักษณะของตัวอย่างที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกันทั้งหมด ดังนั้นจึงทำการวัดหลายๆ ครั้ง แล้วจึงนำเอาข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย

การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา

การหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) ตามวิธีของ AOAC (2003)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

- จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- หลอดทดลอง (Test tube)
- ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Heating water bath, Gallenkamp, England)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator, Gallenkamp, England)
- หม้อนึ่งความดัน (Autocave, Gallenkamp, England)
- เครื่องตีป่น (Laboratory Blender Stomacher : Model 400, Seward Chemical., England)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (Becto ^{R} PCA Plate Count Agar, Difco^{TM}, USA.)
- สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (Peptone, Difco^{TM}, USA.)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 23.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร
2. ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที ในหม้อนึ่งความดัน

วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 ใช้กรรไกรและปากคีบที่ปราศจากเชื้อ โดยการลนไฟ และเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ ตัดตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมักจากบริเวณต่างๆ มาผสมกัน ชั่งน้ำหนักให้ได้ 25 กรัม ใส่ในถุงตีป่น (Stomacher bag) ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 225 มิลลิลิตร ผสมอยู่ นำไปตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร (Stomacher) เป็นเวลา 2 นาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1 : 10(10^{-1})

1.2 เขย่าให้อาหารผสมจาก 1.1 เป็นเนื้อเดียวกันใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1:10 (10^{-1}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมแบบหมุนวน (Vortex) จะได้อาหารที่เจือจาง 1:100 (10^{-2})

1.3 ทำให้อาหารตัวอย่างมีความเจือจาง 1 : 1000 (10^{-3}) ด้วยวิธีตามข้อ 1.2

2. การใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดูดสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมักอาหารที่มีความเจือจางต่างๆ (10^{-1},10^{-2},10^{-3}) ลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางละ 2 จาน โดยเริ่มดูดจากระดับความเข้มข้นที่ต่ำสุด

2.2 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) ที่ยังคงเป็นของเหลวอยู่ที่อุณหภูมิประมาณ 45-55 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อที่มีสารละลายตัวอย่าง โดยใส่ลงในจานละประมาณ 15-20 มิลลิลิตร ให้เสร็จภายในเวลา 1- 2 นาที หลังจากที่ใส่ตัวอย่างลงไปแล้ว

2.3 ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันดี วางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัวจึงคว่ำจานเพาะเชื้อลง

2.4 ทำตัวอย่างควบคุมโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 1 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่างอาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การบ่มเชื้อ

บ่มจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้เสร็จแล้วที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 48±3 ชั่วโมง

การหาปริมาณยีสต์และรา ตามวิธีของ AOAC (2003)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

- จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- หลอดทดลอง (Test tube)
- ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- ตู้บ่มเชื้อ
- หม้อนึ่งความดัน

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

- สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar
- สารละลายกรดทาร์ทาริก ความเข้มข้นร้อยละ 10

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มจนเดือด
2. นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที ในหม้อนึ่งความดัน
3. ปรับอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวให้มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างประมาณ 3.5 ด้วยสารละลายกรดทาร์ทาริก ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยมีอัตราส่วน อาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร ต่อ สารละลายกรดทาร์ทาริก 1.8 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 ใช้กรรไกรและปากคีบที่ปราศจากเชื้อ โดยการลดไฟและเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ ตัดตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมักจากบริเวณต่าง ๆ มาผสมกัน ชั่งน้ำหนักให้ได้ 10 กรัม ใส่ในถุงตีบด (Stomacher bag) ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 90 มิลลิลิตร ผสมอยู่ นำไปตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร (Stomacher) เป็นเวลา 2 นาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:10 หรือ (10^{-1})

1.2 เขย่าให้อาหารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1:10 หรือ (10^{-1}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมแบบหมุนวน (Vortex) จะได้อาหารที่เจือจาง 1:100 หรือ (10^{-2})

1.3 ทำให้อาหารตัวอย่างมีความเจือจาง 1:1000 หรือ (10^{-3}) ด้วยวิธีตามข้อ 1.2

2. การใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดูดสารละลายตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจางต่าง ๆ (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}) ลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางละ 2 จาน โดยเริ่มดูดจากระดับความเข้มข้นที่เจือจางสุด

2.2 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar ที่กำลังหลอมเหลวลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่าง โดยใส่ลงในจานละประมาณ 15-20 มิลลิลิตร ให้เสร็จภายในเวลา 1-2 นาที หลังจากที่ใส่ตัวอย่างลงไปแล้ว

2.3 ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันดี วางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัวจึงคว่ำจานเพาะเชื้อลง

2.4 ทำตัวอย่างควบคุม โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 1 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่างอาหาร

3. การบ่มเชื้อ

บ่มจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้เสร็จเรียบร้อยแล้วที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72±3 ชั่วโมง โดยไม่ต้องกลับด้านจานเพาะเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การหาปริมาณโคลิฟอร์มและอี.โคไล (Coliform and *E. coli*) โดยวิธี MPN (Most probable number method) ตามวิธีของ AOAC (2003)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

- หลอดทดลอง (Test tube) พร้อมหลอดดักก๊าซ (Durham tube)
- ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- ตู้บ่มเชื้อ
- หม้อนึ่งความดัน

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

- สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl sulphate broth
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Brillant green lactose bile broth

วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 ใช้กรรไกรและปากคีบที่ปราศจากเชื้อ โดยการลนไฟและเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ ตัดตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมักจากบริเวณต่าง ๆ มาผสมกัน ให้ได้น้ำหนัก 10 กรัม ใส่ในถุงตีบด (Stomacher bag) ที่มีสารลายลายบัฟเฟอร์เปปโตน 90 มิลลิลิตรผสมอยู่ นำไปตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร (Stomacher) เป็นเวลา 2 นาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:10 หรือ (10^{-1})

1.2 เขย่าให้อาหารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1:10 หรือ (10^{-1}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมแบบหมุนวน (Vortex) จะได้อาหารที่เจือจาง 1:100 หรือ (10^{-2})

2. การวิเคราะห์แบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโคลิฟอร์ม (Presumptive coliforms)

2.1 ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างที่ระดับเจือจางต่าง ๆ (1, 10^{-1} และ 10^{-2}) ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl sulphate broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 ชุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชุดละ 5 หลอดโดยชุดที่ 1 ปิเปตตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 3 หลอด ชุดที่ 2ปิเปตตัวอย่างที่ระดับ 10^{-1} จำนวน 1 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลอง 3 หลอด ชุดที่ 3 ปิเปตตัวอย่างที่ระดับ 10^{-2} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 3 หลอด

2.2 บ่มหลอดเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48±2 ชั่วโมง หากหลอดทดลองใดมีก๊าซเกิดขึ้นในหลอดดักก๊าซ แสดงว่าให้ผลเป็นบวก (Positive) ซึ่งคาดว่าจะมีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดโคลิฟอร์มเจริญอยู่ในตัวอย่างนั้น ถ้าไม่พบก๊าซในหลอดทดลองใดเลยแสดงว่าให้ผลลบ (Negative) และไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดโคลิฟอร์มเจริญอยู่ในตัวอย่าง

2.3 การรายงานจำนวนโคลิฟอร์มในตัวอย่างที่เกิดก๊าซขึ้น ให้เปิดตารางแมคคราดีแล้วรายงานเป็นจำนวนโคลิฟอร์มแบคทีเรียต่อตัวอย่าง 1 กรัม

3. การยืนยันโคลิฟอร์ม

3.1 ใช้ห่วง (Loop) เขี่ยเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลบวก (Positive) จากการทดสอบแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโคลิฟอร์ม ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue agar ในจานเพาะเชื้อ

3.2 บ่มจานเพาะเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.3 ตรวจหาโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของโคลิฟอร์ม โดยโคโลนีของโคลิฟอร์มจะมีสีดำหรือมีสีดำตรงกลางล้อมรอบด้วยบริเวณที่โปร่งใสไม่มีสี โคลิฟอร์มบางโคโลนีมีลักษณะนูนเปียกเยิ้ม (Mucoid)

3.4 บันทึกจำนวนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชุดที่มีเชื้อจุลินทรีย์โคลิฟอร์มที่ได้รับการยืนยันแล้ว

4. การวิเคราะห์แบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E.coli*

4.1 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle) เขี่ยเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลบวก (Positive) จากการทดสอบแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโคลิฟอร์ม ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Brillant green lactose bile broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อต้องปรับให้มีอุณหภูมิเท่ากับ 44.5 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้

4.2 เขี่ยเชื้อ *E. coli* ซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Brillant green lactose bile broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร อีก 2 หลอด เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุม (Control)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3 บ่มหลอดเลี้ยงเชื้อลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 44.5±0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.4 หลอดทดลองที่มีก๊าซเกิดขึ้นหรือให้ผลบวก (Positive) แสดงว่ามีแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็น *E. coli* ให้ทำการวิเคราะห์เพื่อยืนยัน *E. coli*

5. การวิเคราะห์เพื่อยืนยัน *E. coli*

5.1 เขี่ยเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลบวก (Positive) จากการทดสอบแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue agar ในจานเพาะเชื้อ

5.2 บ่มจานเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

5.3 เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *E. coli* ซึ่งมีสีน้ำเงินอมดำตรงกลางและมีสีเลื่อมมันอมเขียวสะท้อนแสงโดยบางครั้งสีเลื่อมมันอาจไม่ปรากฏ เขี่ยเชื้อครั้งละ 1 โคโลนีลงในน้ำทริปโตน (Tryptone water) แล้วบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 44.5±0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.4 เขี่ยเชื้อ *E. coli* มาตรฐานในหลอดน้ำทริปโตน (Tryptone water) เพื่อเป็นตัวอย่างควบคุม

5.5 ทดสอบสารอินโดล หลอดทดลองที่มีอินโดลเกิดขึ้น แสดงว่าเป็นเชื้อ *E. coli* จากนั้นบันทึกจำนวนหลอดทดลองที่ให้ผลบวก (Positive)

5.6 คำนวณและรายงานค่า MPN ของ Coliform และ *E.coli* ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ 1 กรัม

5.7 การทดสอบยืนยันเพิ่มเติมเกี่ยวกับ Coliform และ *E.coli* ควรทำการทดสอบเมธิลเรด (Methyl red) โวเกส-พรอสเกาเออร์ (Voges-Proskauer) และซิเตรต (Citrate test) โดยก่อนจะทดสอบปฏิกิริยาเหล่านี้ต้องแยกเชื้อ *E. coli* ให้บริสุทธิ์ก่อน

การหาปริมาณแอนแอโรบชนิดเทอร์โมฟิลิค (Anaerobe Thermophilic Bacteria) และมีโซฟิลิค (Anaerobe Mesophilic Bacteria) ตามวิธีของ AOAC (2003)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

- จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- หลอดทดลอง (Test tube)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Heating water bath, Gallenkamp, England)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator, Gallenkamp, England)
- หม้อนึ่งความดัน (Autocave, Gallenkamp, England)
- เครื่องตีป่น (Laboratory Blender Stomacher : Model 400, Seward Chemical., England)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Cooked Meat Medium
- พาราฟิน
- สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (Peptone, Difco™, USA.)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Cooked Meat Medium จำนวน 100 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร
2. นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ในหม้อนึ่งความดัน

วิธีวิเคราะห์

4. การเตรียมตัวอย่าง

4.1 ใช้กรรไกรและปากคีบที่ปราศจากเชื้อ โดยการลนไฟ และเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ ตัดตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมักจากบริเวณต่างๆ มาผสมกัน ชั่งน้ำหนักให้ได้ 25 กรัม ใส่ในถุงตีป่น (Stomacher bag) ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 225 มิลลิลิตร ผสมอยู่ นำไปตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร (Stomacher) เป็นเวลา 2 นาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1 : 10(10^{-1})

4.2 เขย่าให้อาหารผสมจาก 1.1 เป็นเนื้อเดียวกันใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1:10 (10^{-1}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมแบบหมุนวน (Vortex) จะได้อาหารที่เจือจาง 1:100 (10^{-2}) หลังจากนั้นทำให้อาหารตัวอย่างมีความเจือจาง 1 : 1000 (10^{-3})

5. การใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1 ใช้ปิเปตขนาด 5 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมักอาหารที่มีความเจือจางต่างๆ (10^{-1},10^{-2},10^{-3}) ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Cooked meat Medium จำนวน 4 หลอดๆละ 1 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางละ 2 หลอด โดยเริ่มดูดจากระดับความเข้มข้นที่ต่ำสุด

5.2 นำหลอดทดลองจากข้อ 5.1 จำนวน 2 หลอดไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที สำหรับ Anaerobe Thermophilic Bacteria แล้วทำให้เย็น เทพาราฟินทับลงไปบนอาหารเลี้ยงเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 หลอด

5.4 ทำตัวอย่างควบคุมโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 1 มิลลิลิตรแทนสารละลายตัวอย่างอาหาร

6. การบ่มเชื้อ

หลอดทดลองจากข้อ 5 จำนวน 2 หลอดนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 72±3 ชั่วโมงสำหรับ Anaerobe Mesophilic Bacteria และอีก 2 หลอดบ่มที่อุณหภูมิ 55±2 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 72±3 ชั่วโมงสำหรับ Anaerobe Thermophilic Bacteria

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง ค-1 : ตารางแมคคราดี

จำนวนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อและจำนวนตัวอย่างที่เจือจางระดับต่างๆ ที่เติมในแต่ละหลอด			MPN ของแบคทีเรียต่อกรัมตัวอย่าง
3 หลอดที่1:10 จำนวน 1 มล.	3 หลอดที่1:100 จำนวน 1 มล.	3 หลอดที่1:1000 จำนวน 1 มล.	
0	0	0	<3
0	0	1	<3
0	1	0	3
0	2	0	6
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
2	3	0	30
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1,100
3	3	3	≥2,400

ที่มา : AOAC (2003)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวศิริลดา ศรีกอก

วัน เดือน ปี เกิด 28 มกราคม 2525

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย
โรงเรียนส่วนบุญโญปถัมภ์ ลำพูน จังหวัดลำพูน
ปีการศึกษา 2542
สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี
สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง
ปีการศึกษา 2546

สถานที่ติดต่อได้ 98/1 ม.5 ต.ป่าซาง อ.ป่าซาง จ.ลำพูน 51120
โทรศัพท์ (053) 522321

E-mail siri_palm@hotmail.com
palm_si_sr@yahoo.com

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved