ภาคผนวก ข

วิธีการตรวจวิเคราะห์

1. ความละเอียด

1.1 เครื่องมือ

1.1.1 แร่งขนาด 0.60 มิลลิเมตร และ 1.20 มิลลิเมตร
1.1.2 เครื่องเขย่าแบบที่เขย่าได้ทั้งแนวระนาบและแนวตั้ง

1.2 วิธีตรวจสอบ

ชั่งตัวอย่าง 100 กรัมใส่ในแร่ง นำไปวางในเครื่องเขย่า เขย่าไปเรื่อยๆ จนกว่าจะได้น้ำหนักที่ค้างบนแร่งและที่ผ่านแร่งไม่เปลี่ยนแปลง แล้วจึงรายงานผลน้ำหนักที่ค้างบนแร่ง

2. ความชื้น (AOAC, 1995)

2.1 เครื่องมือ

2.1.1 จานอะลูมิเนียม(aluminium dish) พร้อมด้วยฝาปิด
2 .1.2 ตู้อบไฟฟ้าที่ปรับและควบคุมอุณหภูมิได้
2.1.3 เดสิกเคเตอร์ที่มีสารดูดความชื้น

2.2 วิธีวิเคราะห์

อบจานอะลูมิเนียมพร้อมด้วยฝาปิดในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 100 ถึง 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำออกมาใส่ในเดสิกเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปชั่ง จดน้ำหนักที่แน่นอน ชั่งตัวอย่างแป้งในจานอะลูมิเนียมให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 2 กรัม อบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 100 ถึง 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำออกมาใส่ในเดสิกเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้องแล้วนำไปชั่ง อบซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 2 มิลลิกรัม จดน้ำหนักที่น้อยที่สุดถือเป็นน้ำหนักของจานอะลูมิเนียมและตัวอย่างหลังจากอบแห้งแล้ว

วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น(ร้อยละของน้ำหนัก)} = \frac{100 \times (W_1 - W_2)}{(W_1 - W)}$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักของจานอะลูมิเนียม เป็นกรัม

W_1 คือ น้ำหนักของจานอะลูมิเนียมและตัวอย่างก่อนอบ เป็นกรัม

W_2 คือ น้ำหนักของจานอะลูมิเนียมและตัวอย่างหลังจากอบแห้งแล้วเป็นกรัม

3. ปริมาณแป้งโดยใช้วิธีโพลาริเมตริก (มอก.52-2516)

3.1 เครื่องมือ

3.1.1 เครื่องชั่งวิเคราะห์อย่างละเอียด (analytical balance) ชั่งได้ละเอียด 0.01 มิลลิกรัม

3.1.2 ขวดแก้วปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 200 และ 250 มิลลิลิตร

3.1.3 เครื่องโพลาริมิเตอร์

3.1.4 กรวยแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 65-70 มิลลิเมตร

3.1.5 อ่างน้ำเดือด (boiling water bath)

3.1.6 กระดาษกรอง (คุณภาพเทียบเท่า Whatman หมายเลข 1)

3.1.7 กระดาษกรอง (คุณภาพเทียบเท่า Whatman หมายเลข 42)

3.1.8 ปิเปตขนาด 50 มิลลิลิตร

3.2 สารเคมี

3.2.1 กรดไฮโดรคลอริกเจือจางร้อยละ 1.128 ของน้ำหนักมาตรฐานหรือ 0.3094 นอร์มอล ตรวจสอบมาตรฐานโดยการไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล ใช้เมทิลเรดเป็นอินดิเคเตอร์ (ร้อยละ 1 ของ เมทิลเรด ในแอลกอฮอล์ที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95) จะต้องใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 30.94 มิลลิลิตร ต่อกรดไฮโดรคลอริก 10 มิลลิลิตร

3.2.2 กรดไฮโดรคลอริกเจือจางร้อยละ 25 ของน้ำหนัก หรือที่มีความถ่วงจำเพาะ 1.126

3.2.3 สารละลายโซเดียมฟอสโฟทังสเตต หรือกรดโดเดคาฟอสโฟทังสติก (Sodium phosphotungstate or dodecaphosphotungstic acid) ร้อยละ 4 ของน้ำหนัก

3.3 วิธีวิเคราะห์

3.3.1 การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่จะทดสอบจะต้องผ่านตะแกรง (sieve) ขนาด 20 เมช ถ้าผ่านไม่ต้องนำมาบดก่อนจะนำไปวิเคราะห์

<u>วิเคราะห์หาโททัลโรทาทอรีเพาเวอร์ (total rotatory power, P)</u>

1. ชั่งตัวอย่าง 5.0000 กรัม ในขวดแก้วปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยผ่านกรวยแก้วที่วางบนปากขวดแก้ว

2. เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.3094 นอร์มอล 50 มิลลิลิตร เขย่าขวดให้เข้ากัน เติมอีก 50 มิลลิลิตร แล้วจุ่มในอ่างน้ำเดือด เขย่าขวดแก้วอย่างสม่ำเสมอนาน 3 นาที

3. แช่ขวดแก้วในอ่างน้ำเดือดรวม 15 นาที ยกขวดแก้วออกจากอ่างแล้วเติมน้ำเย็น 60 มิลลิลิตร ทำให้เย็นทันทีที่ 20 องศาเซลเซียส

4. เติมสารละลายโซเดียมฟอสโฟทังสเตตหรือกรดโดเดคาฟอสโฟทังสติก 20 มิลลิลิตร เขย่าแรง ๆ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 200 มิลลิลิตร ในอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าให้เข้ากัน

5. กรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 1 ทิ้งสารละลายที่กรองได้ครั้งแรก 25 มิลลิลิตร สารละลายที่กรองได้ที่เหลือนำไปใส่ในหลอดแก้วยาว 10 เซนติเมตร ของเครื่องโพลาริมิเตอร์

6. อ่านค่า total rotatory power (P)

วิเคราะห์หา rotatory power ของสารละลายในน้ำ (active water-soluble substance, P')

1. ชั่งตัวอย่าง 12.500 กรัม ในขวดปริมาตร 250 มิลลิลิตร

2. เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร เขย่าให้ตัวอย่างชุ่ม ทิ้งไว้ 1 ชม. พร้อมเขย่าเป็นระยะ ๆ ประมาณ 6 ครั้ง ปรับปริมาตรให้ครบ 250 มิลลิลิตร

3. ทิ้งไว้ให้แป้งตกตะกอน กรองให้ได้สารละลายใสผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 (ทดสอบสารละลายที่กรองว่าไม่มีแป้งปนมาด้วยไอโอดีน)

4. ปิเปตสารละลาย 100 มิลลิลิตร ในขวดปริมาตร 200 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกร้อยละ 25 ปริมาตร 4.2 มิลลิลิตร เขย่าแรง ๆ แล้วจุ่มลงในอ่างน้ำเดือดเช่นเดียวกับวิธีการหา total rotatory power นาน 15 นาที

5. เติมน้ำเย็น 60 มิลลิลิตร แล้วทำให้เย็นทันทีที่ 20 องศาเซลเซียส

6. เติมสารละลายโซเดียมฟอสโฟทังสเตตหรือกรดโดเดคาฟอสโฟทังสติก 20 มิลลิลิตร เขย่าแรง ๆ

7. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 200 มิลลิลิตร ในอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าให้เข้ากัน

8. กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ทิ้งสารละลายที่กรองได้ 25 มิลลิลิตรแรก สารละลายที่กรองได้ นำไปใส่ในหลอดแก้วยาว 10 เซนติเมตร

9. อ่านค่า P' ของสารละลายที่กรองได้

หมายเหตุ : ในกรณีที่ไม่มีสารละลายโซเดียมฟอสโฟทังสเตต หรือ กรดโดเดคาฟอสโฟทังสติก ให้ใช้สารละลายต่อไปนี้แทนได้คือ

1. สารละลายซิงค์ซัลเฟต (zinc sulphate) เข้มข้นร้อยละ 40 ของน้ำหนัก จำนวน 10 มิลลิลิตร

2. สารละลายโปแตสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ (potassium ferrocyanide) เข้มข้นร้อยละ 10 ของน้ำหนักจำนวน 10 มิลลิลิตร

ในการใช้สารละลายทั้งสองอย่างข้างบนนี้ ให้เติมลงไปทีละอย่าง ตามลำดับ

วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณแป้ง (ร้อยละของน้ำหนักเมื่ออบแห้ง)} = \frac{2000 \times (P - P') \times 100 \times 2}{[\alpha]^{E}_{D} \times (100 - M)}$$

P = Total rotatory power, angular degree

P' = Rotatory power ของสารละลายในน้ำ

$[\alpha]^{E}_{D}$ = ค่าเฉพาะของแป้ง, angular degree สำหรับแป้งมันสำปะหลังมีค่า 184.0°

M = ร้อยละของความชื้น

4. เถ้า (AOAC, 1995)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 เครื่องชั่งวิเคราะห์อย่างละเอียด (analytical balance) ชั่งได้ละเอียด 0.01 มิลลิกรัม

4.1.2 จานกระเบื้องเคลือบ (porcelain dish หรือ crucible)

4.1.3 เตาไฟฟ้าที่ปรับและควบคุมอุณหภูมิได้ (electric muffle furnace)

4.1.4 เดสิกเคเตอร์ที่มีสารดูดความชื้น

4.2 วิธีวิเคราะห์

นำตัวอย่างประมาณ 5 กรัม ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน (W) ใส่ในจานกระเบื้องเคลือบที่เผาและชั่งน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว (W_1) นำไปเผาด้วยไฟอ่อนๆจนหมดควัน แล้วนำมาเผาในเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 600 $\pm$ 20 องศาเซลเซียส นานประมาณ 2 ถึง 3 ชั่วโมง จนกระทั่งได้เถ้าสีขาวหรือสีเทานำออกมาใส่ในเดสิกเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปชั่ง เผาตัวอย่างซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 1 มิลลิกรัม ถือเป็นน้ำหนักของจานกระเบื้องเคลือบและตัวอย่างหลังจากเผาจนได้น้ำหนักคงที่ (W_2)

วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละของน้ำหนัก)} = \frac{100 \times (W_2 - W_1) \times 100}{W \times (100 - \%\text{ความชื้น})}$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักของตัวอย่างเป็นกรัม

W_1 คือ น้ำหนักของจานกระเบื้องเคลือบ เป็นกรัม

W_2 คือ น้ำหนักของจานกระเบื้องเคลือบ และตัวอย่างหลังจากเผาจนได้น้ำหนักคงที่เป็นกรัม

5. โปรตีน (AOAC, 1995)

5.1 เครื่องมือ

5.1.1 เครื่องชั่งวิเคราะห์อย่างละเอียด (analytical balance) ชั่งได้ละเอียด 0.01 มิลลิกรัม

5.1.2 เครื่องย่อย

5.1.3 เครื่องกลั่นไนโตรเจน

5.1.4 ขวดแก้วเซดาหล์ (Kjeldahl flask)

5.1.5 บิวเร็ต

5.1.6 ตู้ดูดควัน

5.2 สารเคมี

5.2.1 กรดซัลฟูริกเข้มข้นที่มีความถ่วงจำเพาะ 1.84

5.2.2 สารละลายกรดบอริก ร้อยละ 4 ของน้ำหนัก

5.2.3 สารละลายมาตรฐานไฮดรอครอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

5.2.4 สารละลายละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 40 ของน้ำหนัก

5.2.5 ตัวเร่งปฏิกิริยาประกอบด้วย 3.5 กรัม โพแตสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) และ 0.4 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$)

5.3 วิธีวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัม (ขึ้นกับปริมาณโปรตีนที่มีในแป้ง) ใส่ลงในขวดแก้วเซดาหล์ ระวังอย่าให้ติดข้างขวด ใส่ตัวเร่งปฏิกิริยาจำนวน 1 ช้อน (ประมาณ 7 กรัม) เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นประมาณ 15 มิลลิลิตร แล้วเขย่าเบาๆ วางขวดบนเครื่องย่อยในตู้ดูดควัน ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้สารละลายที่ใส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำไปเข้าเครื่องกลั่นโดยเครื่องนี้ต่อท่อให้ปลายจุ่มในฟลาก์ส ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุกรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 4 จำนวน 25 มิลลิลิตร เพื่อเก็บไอของแอมโมเนียม กลั่นประมาณ 5 นาที แล้วนำไปไตเตรตด้วยสารละลายมาตรฐานไฮดรอครอริก 0.1 นอร์มอล จนกระทั่งเปลี่ยนเป็นสีชมพูแล้วนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน

<u>วิธีคำนวณ</u>

$$\text{ร้อยละไนโตรเจน} = \frac{(S - B) \times N \times 1.401 \times 100}{W \times (100 - \%\text{ความชื้น})}$$

ร้อยละโปรตีน = ร้อยละไนโตรเจน x 6.25

เมื่อ S = ปริมาตรไฮดรอครอริก ที่ใช้ในการไตเตรตสารตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
B = ปริมาตรไฮดรอครอริก ที่ใช้ในการไตเตรตแบลงค์(Blank)
N = นอร์มัลลิตี้ของสารละลายมาตรฐานไฮดรอครอลิก
W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

6. ไขมัน (AOAC, 1995)

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 เครื่องวิเคราะห์ไขมัน
6.1.2 เครื่องทำความเย็น
6.1.3 ถ้วยอะลูมิเนียม (Extraction cups)
6.1.4 คีมสำหรับจับถ้วยอะลูมิเนียม

6.1.5 ทิมเบิล (Thimbles)

6.2 สารเคมี

6.2.1 ปีโตเลียมอีเธอร์ ที่มีจุดเดือด 40-60°C

6.2.2 อะซีโตน

6.2.3 กระดาษกรอง (คุณภาพเทียบเท่า Whatman หมายเลข 1)

6.3 วิธีวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 กรัม (W) ใส่บนกระดาษกรองและห่อให้มิดชิดจากนั้นนำมาใส่ลงในทิมเบิล นำทิมเบิลใส่ใน Extraction unit ซึ่งต่อเชื่อมอยู่กับ Service unit โดยใช้ adapter นำ Extraction cups ที่ทราบน้ำหนักแห้งที่แน่นอนแล้ว(W_1) เติมตัวทำละลายประมาณ 50 มิลลิลิตร นำ Extraction cups วางเข้าไปใน Soxtec System Extraction unit พร้อมทั้งเลื่อนคันโยกไปที่ตำแหน่ง boiling และสกัดเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเลื่อนคันโยกมาที่ตำแหน่ง rinsing ทำการ rinsing เป็นเวลา 45 นาที นำ Extraction cups ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำ Extraction cups ให้เย็นใน เดสิกเคเตอร์ ชั่งน้ำหนัก(W_2) แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ไขมัน

<u>วิธีคำนวณ</u>

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไขมัน} = \frac{(W_2 - W_1) \times 100 \times 100}{W\ (100 - \%\text{ความชื้น})}$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักของตัวอย่างเป็นกรัม

W_1 คือ น้ำหนักของ Extraction cups เป็นกรัม

W_2 คือ น้ำหนักของ Extraction cups และตัวอย่างหลังจากอบแห้งแล้ว เป็นกรัม

7. เส้นใยหยาบ (AOAC, 1995)

7.1 เครื่องมือ

7.1.1 บีกเกอร์ (beaker) ชนิดไม่มีปากหรือขวดแก้วสำหรับย่อยขนาด 600 มิลลิลิตร

7.1.2 เครื่องย่อย (digestion apparatus) ที่มีคอนเดนเซอร์ (condenser) สำหรับควบคุมปริมาตรของสารละลายให้คงที่ตลอดเวลาการย่อย

7.1.3 กระดาษกรองเบอร์ 1 และเบอร์ 42

7.1.4 กูชครูซิเบิล (Gooch crucible) หรืออลันดัมครูซิเบิล ชนิด อาร์ - 98 (alundum crucible R-98)

7.1.5 ตู้อบไฟฟ้าที่ปรับและควบคุมอุณหภูมิได้

7.1.6 เตาเผาไฟฟ้าที่ปรับและควบคุมอุณหภูมิได้

7.1.7 เดสิกเคเตอร์ที่มีสารดูดความชื้น

7.2 สารเคมีและสารละลาย

7.2.1 กรดซัลฟูริกที่มีความเข้มข้น 0.255 นอร์มัล (สารละลาย 100 มิลลิลิตร มีกรด 1.25 กรัม)

7.2.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 0.313 นอร์มัล (สารละลาย 100 มิลลิลิตร มีโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.25 กรัม)

7.2.3 อัลกอฮอล์ที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95

7.3 วิธีวิเคราะห์

7.3.1 ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนัก 2.5 กรัม (W) ใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 600 มิลลิลิตร

7.3.2 เติมกรด H_2SO_4 0.255N ซึ่งต้มเดือดลงไป 200 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องย่อยและต้มให้เดือดต่อ 30 นาที

7.3.3 กรองทันทีด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (ใช้ suction) ล้างด้วยน้ำร้อนจนหมดกรดประมาณ 200 มิลลิลิตร ตรวจสอบด้วยกระดาษลิตมัส

7.3.4 ถ่ายกากบนกระดาษกรองลงในบีกเกอร์เดิมจนหมด จากนั้นย่อยด้วยสารละลาย NaOH 0.313 N ซึ่งต้มเดือดจำนวน 200 มิลลิลิตร

7.3.5 นำไปเข้าเครื่องย่อยทันที และต้มให้เดือดต่อไปอีก 30 นาที เช่นเดียวกับครั้งแรก กรองทันทีผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 (ใช้ suction) ล้างด้วยน้ำร้อนจนหมดด่างประมาณ 200 มิลลิลิตร ตรวจสอบด้วยกระดาษลิตมัส

7.3.6 ล้างกากที่เหลือด้วยอัลกอฮอล์ (95%) 10 มิลลิลิตร นำกระดาษกรองใส่ครูซิเบิลแล้วไปอบให้แห้งในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 100 ถึง 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง

7.3.7 นำออกมาใส่ในเดสิกเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้องนำไปชั่งอบตัวอย่างนี้ซ้ำ นานครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 1 มิลลิกรัม จดน้ำหนักที่น้อยที่สุดถือเป็นน้ำหนักของครูซิเบิลและกากหลังจากอบแห้งแล้ว (W_1)

7.3.8 นำครูซิเบิลพร้อมด้วยกากที่อบแห้ง ไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 ± 20 องศาเซลเซียสนานประมาณ 30 นาที (จนขาว) แล้วนำออกมาใส่ใน เดสิก-เคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้อง

7.3.9 นำไปชั่ง แล้วเผาซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 1 มิลลิกรัม จดน้ำหนักที่น้อยที่สุดถือเป็นน้ำหนักของครูซิเบิลและเถ้าหลังจากเผาแล้ว (W_2)

7.3.10 ผลแตกต่างระหว่าง การชั่งน้ำหนักทั้งสองครั้ง คือ น้ำหนักของเส้นใย

<u>วิธีคำนวณ</u>

$$\text{ร้อยละเส้นใย} = \frac{100 \times (W_1 - W_2 - \text{นน.กระดาษกรอง})}{W}$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักของตัวอย่างเป็นกรัม

W_1 คือ น้ำหนักของครูซิเบิลและกากหลังจากอบแห้งแล้ว เป็นกรัม

W_2 คือ น้ำหนักของครูซิเบิลและเถ้าหลังจากเผาแล้ว เป็นกรัม

8. ความเป็นกรดด่าง (AOAC, 1995)

8.1 เครื่องมือ

8.1.1 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

8.2 วิธีวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่าง 20 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นต้มเดือดและทิ้งไว้ให้เย็น 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร กวนอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งให้ตกตะกอนเป็นเวลา 10 นาที จึงนำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

9. ไซยาไนด์ทั้งหมด (O' Brien และคณะ, 1994)

9.1 เครื่องมือ

9.1.1 เครื่องวัดการส่องผ่านแสง (spectrophotometer)
9.1.2 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
9.1.3 ปิเปต
9.1.4 เครื่องผสมตัวอย่าง (mixer)
9.1.5 หลอดทดลองพร้อมฝาปิด

9.2 สารเคมี เอนไซม์และวิธีการเตรียม

9.2.1 สารละลายสกัด (extraction medium) เตรียมโดยใช้กรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และปรับปริมาตรด้วยเอธานอลให้มีความเข้มข้นของเอธานอลร้อยละ 25 (ปริมาตร/ปริมาตร)

9.2.2 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6 และ 7

9.2.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

9.2.4 เอนไซม์ลินามาเรส (linamarase) มีกิจกรรมของเอนไซม์ 5 Unit ต่อมิลลิลิตร

9.2.5 สารละลายคลอรามีนที (Chloramine T) เตรียมโดยใช้ปริมาณ 0.5 กรัม ละลายในน้ำ ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายนี้ใหม่ทุกครั้งที่ทดลอง

9.2.6 สารละลายไพริดีน/ไพราโซโลน (pyridine/pyrazolone reagent) เตรียมโดยใช้บีสไพราโซโลน (bispyrazolone) ปริมาณ 0.2 กรัม และเมทธิล-ฟีนิล-ไพราโซโลน (3-methyl-1-phenyl-5-pyrazolone) ปริมาณ 1 กรัม แล้วนำมาปรับปริมาตรด้วยไพริดีน (pyridine) เป็น 200 มิลลิลิตร เตรียมและเก็บในขวดสีชาและใช้ได้ภายใน 2 วัน

9.3 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณไซยาไนด์ทั้งหมด

9.3.1 ทำการสกัดแยกไซยาไนด์ออกจากตัวอย่างโดยใช้สารละลายสกัด ปริมาตรที่ใช้ขึ้นกับปริมาณไซยาไนด์ที่มีในตัวอย่าง นำมาปั่นให้เข้ากันแล้วกรองแยกเอาส่วนใสด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

9.3.2 แยกส่วนใสที่สกัดได้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติม 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 และเอนไซม์ลินามาเลสลงไป ปริมาตร 0.4 และ 0.1 มิลลิลิตร ตามลำดับ

9.3.3 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9.3.4 เติม 0.2 โมลารโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.6 มิลลิลิตร แล้วเขย่าเพื่อหยุดปฏิกิริยา เติม 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6 ปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร และคลอลามีนที 0.2 มิลลิลิตร แล้วแช่น้ำเย็นนาน 5 นาที

9.3.5 เติมสารละลายไพริดีน/ไพราโซโลน ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 90 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโมเมตร

9.3.5.1 ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้โปแตสเซียมไซยาไนด์ ความเข้มข้น 0–250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบเท่าไฮโรเจนไซยาไนด์ 0–100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

9.3.5.2 คำนวณปริมาณไซยาไนด์ทั้งหมดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้

<u>วิธีคำนวณ</u>

$$\text{ปริมาณไซยาไนด์ทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมโดยน้ำหนักแห้ง)} = \frac{B \times C \times \text{อัตราการเจือจางของตัวอย่าง} \times 100}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน} \times A \times (100-M)}$$

เมื่อ A คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

B คือ ปริมาณสารที่ใช้สกัด (มิลลิลิตร)

C คือ ค่าการดูดกลืนแสง

M คือ ร้อยละของความชื้น

9.4 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณนอนไซยาโนจินิคกลูโคไซด์ (Non cyanogenic glucoside)

9.4.1 แยกส่วนใสที่สกัดได้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติม 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.0 ปริมาตร 0.4 เขย่าให้เข้ากัน

9.4.2 เติม 0.2 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 5 นาที เติม 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6 ปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร และคลอลามีนที 0.2 มิลลิลิตร แล้วแช่น้ำเย็นนาน 5 นาที

9.4.3 เติมสารละลายไพริดีน/ไพราโซโลน ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 90 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโมเมตร

9.4.3.1 ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้โปแตสเซียมไซยาไนด์ ความเข้มข้น 0–250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบเท่าไฮโรเจนไซยาไนด์ 0–100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

9.4.3.2 คำนวณปริมาณไซยาไนด์ทั้งหมดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายโปตัสเซียมไซยาไนด์เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์ และทำการคำนวณกลับให้อยู่ในรูปของไฮโดรเจนไซยาไนด์

<u>วิธีคำนวณ</u>

$$\text{ปริมาณ non cyanogenic glucoside (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมโดยน้ำหนักแห้ง)} = \frac{\text{B x C x อัตราการเจือจางของตัวอย่าง x 100}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน x A x (100-M)}}$$

เมื่อ A คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

B คือ ปริมาณสารที่ใช้สกัด (มิลลิลิตร)

C คือ ค่าการดูดกลืนแสง

M คือ ร้อยละของความชื้น

Bound cyanide = Total cyanide – Non cyanogenic glucoside

10. ความหนืด โดยเครื่อง Rapid vico analyser (RVA)

10.1 เครื่องมือ

10.1.1 เครื่องวัดความหนืด Rapid vico analyser (RVA)

10.2 วิธีวิเคราะห์

10.2.1 โดยเตรียมตัวอย่างโดยชั่งตัวอย่าง 3.00 กรัม (ความชื้นแป้ง 14.0%) เติมน้ำ 25.00 กรัม ใส่ลงในถ้วยตัวอย่างอะลูมิเนียม ใช้ใบกวนตัวอย่างให้เข้ากัน

10.2.2 นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง RVA โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ตาม Standard 1 ดังนี้

Boot Ideal Temperature 50 °C

Idle Tolerance 1 °C

Time	Type	Value	
0:00:00	Temperature	50	
0:00:00	Speed	960	
0:00:00	Speed	160	
0:01:00	Temperature	50	(12 °C/min)
0:04:45	Temperature	95	
0:07:15	Temperature	95	
0:11:00	Temperature	50	

End of test 0:13:00

10.2.3 การคำนวณน้ำหนักตัวอย่างและน้ำหนักน้ำที่ใช้ เพื่อให้ได้ความชื้นตัวอย่างเท่ากับร้อยละ 14 ที่ใช้ในการวิเคราะห์มาตรฐานด้วยเครื่อง RVA สามารถ

<u>คำนวณ</u> ได้ดังนี้

$$M_1 = \frac{100 \times 2.58}{(100 - M)}$$

$$W_1 = 28.0000 - M_1$$

เมื่อ M คือ ร้อยละ ความชื้นจริงของตัวอย่าง

M_1 คือ น้ำหนักตัวอย่างที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์ (กรัม) เทียบเท่ากับตัวอย่าง 3 กรัม ที่ความชื้นร้อยละ14

W_1 คือ น้ำหนักน้ำที่ต้องเติมจริง (กรัม)

11. ความขาว โดยเครื่อง Kett

11.1 เครื่องมือ

11.1.1 เครื่องวัดความขาว (Kett Digital Whiteness Meter (Model C-100))

11.2 วิธีวิเคราะห์

11.2.1 ทำการ calibrate เครื่องโดยใส่ calibrate plate ลงใน sample dish facing แล้วปิดด้วย glass filter cover จากนั้นประกอบเข้าด้วยกันกับ sampling case และใส่ลงในช่องใส่ตัวอย่าง ค่าจะแสดงขึ้นบนจอ แล้วกดปุ่ม SENS.(sensitivity) เครื่องจะ calibrate ให้เอง

11.2.2 การวัดความขาวของแป้งทำได้โดยใส่ตัวอย่างแป้งใน sampling dish ให้มากเกินพอเล็กน้อย ปิดด้วย glass filter cover แล้วประกอบเข้ากับ sampling case แล้วใส่ในช่องตัวอย่าง ค่าจะแสดงขึ้นบนจอ ค่าที่ได้เป็นค่าที่เปรียบเทียบกับ แมกนีเซียมออกไซด์ ซึ่งมีค่าความขาวเป็น 100 ดังนั้นค่าที่เป็นตัวเลขมาก แสดงว่ามีความขาวมาก

12. ค่าวอเตอร์แอคติวิตี (a_w) โดยเครื่องวอเตอร์แอคติวิตี

12.1 เครื่องมือ

12.1.1 เครื่องวัดค่าวอเตอร์แอคติวิตี

12.2 วิธีวิเคราะห์

12.2.1 ทำการปรับค่ามาตรฐานโดยใช้เกลือที่ทราบค่า a_w ที่ระดับต่างๆ

12.2.2 นำตัวอย่างบรรจุลงในตลับพลาสติกสำหรับวัดค่า a_w โดยบรรจุตัวอย่างประมาณ 1 ใน 3 ของความจุตลับ นำตลับตัวอย่างวางลงในช่องตรวจวัดของเครื่อง หมุนปุ่มไปที่อ่านค่า รอจนกระทั่งเครื่องอ่านค่า ทำการบันทึกผล

13. ปริมาณอะฟลาทอกซิน (ELISA method)

13.1 เครื่องมือ

13.1.1 เครื่อง Micro ELISA Reader อ่านค่าที่ 450 นาโนเมตร

13.1.2 ชุดเครื่องแก้วทำเคมีวิเคราะห์

13.1.3 เครื่องปั่นผสมไฟฟ้า (Moulinex)

13.1.4 เครื่องผสม (Vortex Mixer)

13.2 สารเคมี

13.2.1 ชุดตรวจสอบสารอะฟลาทอกซิน (DOA-Aflatoxin ELISA Test Kit) ของกรมวิชาการเกษตร ประกอบด้วย

13.2.1.1 Micro ELISA plate ที่เคลือบด้วยแอนตีบอดีต่อสารอะฟลาทอกซิน B1

13.2.1.2 สาร AFB1 มาตรฐานที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, และ 5.0 ppb

13.2.1.3 AFB1-HRP Conjugate จำนวน 6 หลอด บรรจุหลอดละ 100 ไมโครลิตร

13.2.1.4 Substrate A และ B อย่างละ 6 มิลลิลิตร ทำการผสมกัน 1 : 1 ก่อนใช้

13.2.1.5 Conjugate buffer ปริมาตร 8 มิลลิลิตร

13.2.1.6 Washing buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 100 มิลลิลิตร ทำการเจือจาง 10 เท่าก่อนใช้

13.3 วิธีวิเคราะห์

13.3.1 ชั่งตัวอย่าง 20 กรัม และเติม 70% เมทธานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตรลงในเครื่องปั่น ทำการปั่นผสมนาน 3 นาที

13.3.2 ตั้งตัวอย่างที่ปั่นผสมแล้วทิ้งไว้ประมาณ 5 – 10 นาที นำมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ส่วนใสที่กรองได้มีความเข้มข้นเป็น 1 : 5 เท่า ให้ทำการเจือจางเป็น 1 : 20 เท่า โดยใช้สารละลาย 0.01 โมลาร์ PBS-T โดยใช้สารสกัดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร + สารละลาย 0.01 โมลาร์ PBS-T 3 มิลลิลิตร

13.3.3 ก่อนทำการวิเคราะห์ต้องนำสารในชุดตรวจสอบมาวางให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง พร้อมทั้งสารละลายที่ใช้ในการเจือจางสารสกัดตัวอย่าง (0.01 โมลาร์ PBS-T)

13.3.4 นำเอนไซม์คอนจูเกตออกมาจากช่องแช่แข็ง จำนวนหลอดเท่ากับที่ต้องการใช้ในแต่ละครั้ง ส่วนที่เจือจางแล้วถ้าใช้ไม่หมดปิดฝาให้สนิทและเก็บไว้ที่ 5 °C

13.3.5 นำ stripe ออกจากถุงฟอยด์เท่าที่ต้องการใช้ในแต่ละครั้ง stripe ที่เหลือเก็บในถุงเดิม ที่ 5 °C อย่าให้ถูกน้ำ

13.3.6 หยดสารมารตรฐานอะฟลาทอกซิน ระดับความเข้มข้นต่างๆ (4-5 ความเข้มข้น) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมทดสอบ

13.3.7 หยดเอนไซม์คอนจูเกต (AFB-HRP conjugate) ที่เจือจางใน conjugate buffer แล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงไปทุกหลุมทดสอบ เขย่าเล็กน้อย และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

13.3.8 หลังจากครบเวลาบ่มแล้ว เทสารในหลุมทดสอบทิ้งโดยการคว่ำหลุม ล้างหลุมทดสอบ โดยเติม washing buffer (PBS-T) ลงในหลุมให้เต็มทุกหลุม แล้วคว่ำทิ้ง ทำการล้างอย่างน้อย 3 ครั้ง คว่ำหลุมทดสอบลงบนกระดาษซับแล้วเคาะให้แห้ง

13.3.9 หยด substrate ที่เตรียมใหม่ๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุมทดสอบ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด 5 – 10 นาที จะเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นสีฟ้าตามปริมาณความเข้มข้นของสารพิษ ตัวอย่างที่มีสีฟ้าเข้มแสดงว่าไม่สารพิษหรือมีน้อย และตัวอย่างที่มีสีฟ้าจางหรือขาวแสดงว่ามีสารพิษมาก

13.3.10 หยุดปฏิกิริยาโดยเติม stopping solution (0.5 โมลาร์ Phosphoric acid) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปฏิกิริยาจะเปลี่ยนจากสีฟ้า เป็นสีเหลือง และอ่านค่าความเข้มข้นของสีด้วย Micro ELISA Reader ที่ช่วงความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร อ่านปฏิกิริยาภายใน 60 นาที หลังจากหยุดปฏิกิริยา

<u>วิธีคำนวณ</u>

ทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยกราฟมาตรฐานเป็นกราฟ semi-logarithm ระหว่าง % Maximal binding กับค่า log ของความเข้มข้นของสารอะฟลาทอกซินมาตรฐาน (หน่วยเป็น ppb)

$$\text{โดย \% Maximal binding} = \frac{B \times 100}{B_0}$$

โดยที่ B คือ ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของตัวอย่างหรือสารมาตรฐานที่ระดับต่างๆ

B_0 คือ ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ระดับ 0 ppb

14. จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (AOAC, 1995)

14.1 เครื่องมือ

14.1.1 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petridish)

14.1.2 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

14.1.3 เครื่องวัดพีเอช

14.1.4 หม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง (autoclave)

14.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

14.2.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 7.2

14.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Standard plate count agar

14.3 วิธีวิเคราะห์

14.3.1 ชั่งตัวอย่างอาหาร ปริมาณ 25 กรัม เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.2 ปริมาตร 225 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (อัตราการเจือจาง 1:10)

14.3.2 เตรียมเป็นสารละลายตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, ….. ตามลำดับ

14.3.3 ดูดสารละลายแต่ละอัตราการเจือจางของตัวอย่างอาหารปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยแต่ละอัตราการเจือจางทำ 2 ซ้ำ

14.3.4 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ (Plate count agar) ที่หลอมเหลวและทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 44 ถึง 46 องศาเซลเซียส ปริมาตร 15 ถึง 20 มิลลิลิตร ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

14.3.5 ผสมให้เข้ากันกับสารละลายเจือจางของตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยแกว่ง จานเพาะเลี้ยงเชื้อไปด้านซ้าย และขวา

14.3.6 ทิ้งจานเพาะเลี้ยงเชื้อไว้ประมาณ 20 นาที เพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว คว่ำจานเพาะเลี้ยงเชื้อให้วุ้นอยู่ด้านบนป้องกันไม่ให้หยดน้ำจากฝาจานเพาะเลี้ยงเชื้อหยดลงบนผิววุ้น ซึ่งจะทำให้โคโลนีของบักเตรีเกิดการแผ่กว้าง (spread) จะทำให้ไม่สามารถนับจำนวนโคโลนีได้

14.3.7 นำไปเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ถึง 37 องศาเซลเซียส นาน 48 $\pm$ 2 ชั่วโมง

14.3.8 เลือกจานเพาะเลี้ยงเชื้อของอัตราการเจือจางที่มีนับจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง

ระหว่าง 30 ถึง 300 โคโลนี

14.3.9 รายงานผลการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต่อกรัมของตัวอย่าง โดยคูณจำนวนโคโลนีที่นับได้ด้วยระดับความเจือจางที่ตรวจนับ

15. จำนวนยีสต์และราทั้งหมด (AOAC, 1995)

15.1 เครื่องมือ

15.1.1 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petridish)

15.1.2 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

15.1.3 หม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง (autoclave)

15.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

15.2.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 7.2

15.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ (Potato dextrose agar)

15.3 วิธีวิเคราะห์

15.3.1 ชั่งตัวอย่างอาหาร ปริมาณ 25 กรัม เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.2 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (อัตราการเจือจาง 1:10)

15.3.2 จากนั้นเตรียมสารละลายที่มีระดับความเจือจาง $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, ….. ตามลำดับ

15.3.3 ดูดสารละลายแต่ละอัตราการเจือจางของตัวอย่างอาหารปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ (Potato Dextrose agar) อยู่แล้ว โดยแต่ละอัตราการเจือจางทำ 2 ซ้ำ

15.3.4 ทำการ surface spread โดยการใช้แท่งแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้ว

15.3.5 คว่ำจานเพาะเลี้ยงเชื้อให้วุ้นอยู่ด้านบน แล้วนำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3-5 วัน

15.3.6 นับจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีของยีสต์และราอยู่ระหว่าง 15 ถึง 150

โคโลนี โดยนับแยกกัน

15.3.7 รายงานผลการตรวจนับจำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมดต่อกรัมโดยคูณจำนวนโคโลนีที่นับได้ด้วยระดับความเจือจางที่ตรวจนับ

16. การตรวจหา *Salmonella* sp. (AOAC, 1995)

16.1 เครื่องมือ

16.1.1 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petridish)

16.1.2 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

16.1.3 หม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง (autoclave)

16.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

16.2.1 สารละลายเปปโตนบัฟเฟอร์

16.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Rappaport Vaselladis broth, Tetrathionate broth,

16.3 วิธีวิเคราะห์

16.3.1 Non-selective pre-enrichment

ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ใน stomacher bag แล้วเติม Buffer peptone water (BPW) 225 มิลลิลิตร เป็น pre-enrichment ตีให้ผสมกันด้วยเครื่องประมาณ 2 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง

16.3.2 Selective enrichment

16.3.2.1 ใช้ sterile pipet ดูดตัวอย่างอาหารจากข้อ 15.3.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Tetrathionate (TT) broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

16.3.2.2 ใช้ sterile pipet ดูดตัวอย่างอาหารจากข้อ 16.3.1 ปริมาตร 0.1มิลลิลิตร ใส่ลงใน Rappaport Vassiliadis (RV) medium นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

16.3.3 Selective plating

16.3.3.1 ปั่นอาหาร TT broth และ RV medium ที่ครบกำหนดเวลาบ่ม ด้วยเครื่อง ปั่นผสมให้เข้ากัน ใช้ loop ถ่ายของเหลว 1 loop streak ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (selective media) 2 ชนิด คือ Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar และอาหาร Hektoen enteric (HE) agar ตัวอย่างละ 2 จานนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

16.3.3.2 ตรวจผลการทดสอบโดยสังเกตลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้

- Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar โคโลนีของเชื้อซัลโมเนลลา มีลักษณะกลม ขนาดประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ผิวนูนเรียบ ขอบเรียบ ใส อาจมีจุดสีดำอยู่ตรงกลาง หรือไม่มีก็ได้

- Hektoen enteric (HE) agar โคโลนีของเชื้อซัลโมเนลลา มีลักษณะกลม ขนาดประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ผิวนูนเรียบ ขอบเรียบ ใส อาจมีจุดสีดำอยู่ตรงกลาง หรือไม่มีก็ได้

16.3.3.3 การทดสอบทางชีวเคมี เลือกโคโลนีที่ให้ลักษณะบวกกับอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 15.3.3.2 มาทำการทดสอบดังต่อไปนี้

- Triple sugar iron (TSI) agar ใช้ loop แตะเชื้อจากข้อ 15.3.3.2 streak ลงบนผิว (slant) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วแทง loop ลงไปในเนื้ออาหารจนถึงก้นหลอด (butt) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง แล้วนำมาอ่านผลดังนี้

Slant

บวก : สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีจากสีแดง-ส้ม เป็นสีเหลือง (acid หรือ A) แสดงว่ามีการใช Lactose และ/ หรือ Sucrose (Lactose and / or Sucrose positive)

ผลลบ : สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีจากสีแดง-ส้ม เป็นสีแดงเข้ม

(alkaline หรือ K) หรือไม่เปลี่ยนสี (N) แสดงว่าไม่มีการใช้ Lactose และ Sucrose (Lactose and / or Sucrose negative)

Butt

ผลบวก : สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แสดงว่ามีการ ferment glucose (glucose positive)

ผลลบ : สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือไม่เปลี่ยนสี แสดงว่าไม่มีการ ferment glucose (glucose negative)

H_2S

ผลบวก : ก้นหลอดเป็นสีดำ แสดงว่ามีการสร้าง H_2S (H_2S positive)

ผลลบ : ก้นหลอดไม่เป็นสีดำ แสดงว่าไม่มีการสร้าง H_2S (H_2S negative)

Gas

ผลบวก : ก้นหลอดมีรอยแยกแตกของอาหาร แสดงว่ามีการสร้าง Gas (Gas fermation from glucose)

ผลลบ : ก้นหลอดไม่มีรอยแยกแตกของอาหาร แสดงว่าไม่มีการสร้าง Gas และไม่มีการใช้ Lactose

17. การตรวจหา *Staphylococcus aureus* (AOAC, 1995)

17.1 เครื่องมือ

17.1.1 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petridish)

17.1.2 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

17.1.3 หม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง (autoclave)

17.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

17.2.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 7.2

17.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Baird – Parker agar (BPA)

17.3 วิธีวิเคราะห์

17.3.1 ชั่งตัวอย่างอาหาร ปริมาณ 25 กรัม เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (อัตราการเจือจาง 1:10)

17.3.2 จากนั้นเตรียมสารละลายที่มีระดับความเจือจาง $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, ….. ตามลำดับ

17.3.3 ดูดสารละลายแต่ละอัตราการเจือจางของตัวอย่างอาหารปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ(BPA) อยู่แล้ว โดยแต่ละอัตราการเจือจางทำ 2 ซ้ำ

17.3.4 ทำการ surface spread โดยการใช้แท่งแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้ว

17.3.5 คว่ำจานเพาะเลี้ยงเชื้อให้วุ้นอยู่ด้านบน แล้วนำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3-5 วัน

17.3.6 นับจำนวนโคโลนีของ *S. aureus* ซึ่งมีสีดำ รอบโคโลนีปรากฏวงใส (clear zone) ใต้ โคโลนีพบตะกอนขุ่นขาว(opaque zone) เนื่องจากการย่อยไข่แดงของเอนไซม์ lecithinese ที่ผลิตโดย *S. aureus* นับโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าว คำนวณแสดงจำนวนเป็น CFU/g ตัวอย่าง

18. การตรวจหา *Escherichia coli* (AOAC, 1995)

18.1 เครื่องมือ

18.1.1 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petridish)

18.1.2 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

18.1.3 หม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง (autoclave)

18.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

18.2.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 7.2

18.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Chromocult Coliform agar

18.3 วิธีวิเคราะห์

18.3.1 ชั่งตัวอย่างอาหาร ปริมาณ 25 กรัม เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (อัตราการเจือจาง 1:10)

18.3.2 เตรียมเป็นสารละลายตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, ….. ตามลำดับ

18.3.3 ดูดสารละลายแต่ละอัตราการเจือจางของตัวอย่างอาหารปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยแต่ละอัตราการเจือจางทำ 2 ซ้ำ

18.3.4 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Chromocult Coliform agar ที่หลอมเหลวและทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ ประมาณ 44 ถึง 46 องศาเซลเซียส ปริมาตร 15 ถึง 20 มิลลิลิตร ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

18.3.5 ผสมให้เข้ากันกับสารละลายเจือจางของตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยแกว่งจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปด้านซ้าย และขวา เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว เทอาหารทับหน้าอีกประมาณ 5 มิลลิลิตร

18.3.6 ทิ้งจานเพาะเลี้ยงเชื้อไว้ประมาณ 20 นาที เพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว คว่ำจานเพาะเลี้ยงเชื้อให้วุ้นอยู่ด้านบนป้องกันไม่ให้หยดน้ำจากฝาจานเพาะเลี้ยงเชื้อหยดลงบนผิววุ้น

18.3.7 นำไปเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส นาน 24 – 48 ชั่วโมง

18.3.8 เลือกนับจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีสีม่วงแดง ซึ่งเป็นโคโลนีของ *E. coli*

18.3.9 รายงานผลการตรวจนับจำนวน *E. coli E. coli* ต่อกรัมของตัวอย่าง โดยคูณจำนวนโคโลนีที่นับได้ด้วยระดับความเจือจางที่ตรวจนับ

19. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

19.1 Standard Plate Count Agar

Typtone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดโดยการต้มให้เดือด นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นจนได้อุณหภูมิประมาณ 45°C เทลงในจานเพาะเชื้อ

19.2 Buffer peptone water (BPW)

Peptone	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Disodium hydrogen	3.5	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	1.5	กรัม
pH 7.2		
Distilled Water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

19.3 Tetrathionate (TT) broth

Peptone	5.0	กรัม
Bile salts	1.0	กรัม
Calcium carbonate	10.0	กรัม
Sodium thiosulphate (anhydrous)	30	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ แบ่งใส่หลอดละ 9 มิลลิลิตร

19.4 Rappaport Vassiliadis (RV) medium

Soya peptone	4.5	กรัม
Sodium chloride	7.2	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	1.26	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	0.18	กรัม
Malachite green	0.036	กรัม
Magnesium chloride (anhydrous)	13.58	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร แบ่งใส่หลอด หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

19.5 Xylose lysine deoxycholate (XLD) agar

Yeast extract	3.0	กรัม
L-Lysine HCL	5.0	กรัม
Xylose	3.75	กรัม
Lactose	7.5	กรัม
Sucrose	7.5	กรัม
Sodium deoxycholate	1.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Sodium thiosulfate	6.8	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.8	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม
Agar	12.5	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ

19.6 Hektoen enteric (HE) agar

Peptone	13.8	กรัม
Yeast extract	2.0	กรัม
Lactose	12.0	กรัม
Sucrose	12.0	กรัม
Saliein	1.0	กรัม
Sodium tauroglycocholate	6.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Sodium thiosulphate (anhydrous)	1.25	กรัม
Ferric ammonium citrate	1.25	กรัม
Acid fuchsin	0.1	กรัม

Bromo – thymol blue	0.065	กรัม
Agar	14.0	กรัม
Distilled water	1,000	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ

19.7 Triple sugar iron (TSI) agar

Meat Extract	4.0	กรัม
Yeast Extract	3.0	กรัม
Peptone	18.0	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Sodium thiosulfate	0.3	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Sucrose	10.0	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
Ferric amonium citrate	0.2	กรัม
Phenol red	0.025	กรัม
Agar	14.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร แบ่งใส่หลอด หลอดละประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที นำมาเอียงให้มีความลึกก่อนถึงผิวเอียง ประมาณ 1 นิ้ว

19.8 Baird – Parker agar

Tryptone	10.0	กรัม
Beef extract	5.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
Glycine	12.0	กรัม
$LiCl_2.6H_2O$	5.0	กรัม

Agar	20.0	กรัม

เตรียม base medium โดยการละลายส่วนประกอบอาหารในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร ต้มให้ส่วนประกอบและวุ้นละลาย ปรับ pH เป็น 6.8 – 7.2 แล้วบรรจุขวดละ 95 มิลลิลตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที

เตรียม 1% potassium tellurite โดยละลาย potassium tellurite 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กำจัดเชื้อโดยการกรอง

เตรียม egg yolk tellurite enrichment เพื่อผสมลงใน base medium มีวิธีการดังต่อไปนี้ ล้างเปลือกไข่ให้สะอาด เช็ดให้แห้ง นำไปแช่ใน 70% ethyl alcohol นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเท ethyl alcohol ออก นำไข่ไปวางบนจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วทิ้งไว้จนเปลือกไข่แห้ง ต่อยเปลือกไข่ให้แตกออกด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ แยกไข่แดงออกจากไข่ขาว ผสมไข่แดง 3ส่วนกับน้ำเกลือ 0.85% (normal saline) 7 ส่วน ปั่นที่ความเร็วสูงเป็นเวลา 5 วินาที ด้วย blender ที่สะอาด ปราศจากเชื้อ ผสมไข่แดงที่ปั่นแล้ว 50 มิลลิลิตร กับ 1 % potassium tellurite (กำจัดเชื้อโดยการกรองผ่าน membrane) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี (จะได้ egg yolk tellurite enrichment) เมื่อจะใช้อาหารนี้ ให้ผสม egg yolk tellurite enrichment จำนวน 5 มิลลิลิตร ซึ่งอุ่นที่อุณหภูมิ 45 – 50 °C ลงในขวด base medium จำนวน 95 มิลลิลิตร ที่หลอมแล้วทิ้งให้เย็น 45 – 50 °C เขย่าให้กระจายทั่วกันก่อนเทลงจานเลี้ยงเชื้อ

19.9 Chromocult Coliform Agar (CCA)

Chromocult Coliform Agar	200.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมโดยการต้มให้เดือดจนวุ้นละลายหมด นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 45-48 °C (เตรียมและใช้ทันทีไม่สามารถเก็บได้)

19.10 Potato Dextrose Agar

Potato infision	200.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดโดยการต้มให้เดือด นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นจนได้อุณหภูมิประมาณ 45°C ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็น 3.5 โดยใช้สารละลายทาร์ทาร์ริก เข้มข้นร้อยละ 10 ซึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ผสมให้เข้ากันก่อนเทลงในจานเพาะเชื้อ

20. การวิเคราะห์ปริมาณเส้นใยอาหาร (AOAC, 1995)

20.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

20.1.1 ครูซิเบิลแก้ว (Gooch Crucible P2 และ Gooch Crucible P4)

20.1.2 ปั๊มสุญญากาศ

20.1.3 เตาอบไฟฟ้า 105 °C

20.1.4 เตาเผา

20.1.5 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

20.1.6 บีกเกอร์ขนาด 400 และ 600 มิลลิลิตร

20.1.7 เครื่องชั่งน้ำหนัก

20.1.8 เดสิกเคเตอร์

20.2 สารเคมี

20.2.1 เอทานอล ความเข้มข้น 80% และ 100%

20.2.2 อะซีโตน

20.2.3 0.1 โมลาร์พอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0

20.2.4 เอนไซม์อัลฟลาอะไมเลส ชนิดไม่ทนร้อน Type VI-B No.A-3176 (Sigma) ละลายเอนไซม์ 5 กรัมใน 0.1 โมลาร์พอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 1500 g 15 นาที กรองผ่าน Gooch Crucible P2 เก็บที่ 4 °C ต้องเตรียมใหม่ทุกวันก่อนใช้งาน

20.2.5 เอนไซม์อัลฟลาอะไมเลส ชนิดทนร้อน No.A-3306 (Sigma)

20.2.6 เอนไซม์โปรตีเอส No.3910 (Sigma)

20.2.7 เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส จาก *Aspergillus niger* No. A9913 (Sigma)

20.2.8 2.0 โมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.5

20.2.9 สารละลาย 2.0 โมลาร์โซเดียมอะซิเตท

20.2.10 ซีไลท์ ที่ผ่านการล้างด้วยกรด HCl และล้างจนหมดกรด และอบแห้ง

20.3 การวิเคราะห์

เนื่องจากในฟลาวมันสำปะหลังมีปริมาณไขมันต่ำ จึงไม่ต้องทำการสกัดไขมันออกก่อนทำการวิเคราะห์

<u>การหาปริมาณเส้นใยที่ละลายได้ (Soluble fiber)</u>

1. ชั่งตัวอย่างน้ำหนักที่แน่นอน 0.5 กรัม (S_1) ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และต้มในน้ำเดือด 5 นาที เขย่าตลอดเวลา

2. นำไปเข้าเครื่อง autoclave ที่ 120 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อเย็นนำออกจากเครื่อง autoclave

3. เติมเอนไซม์แอลฟลาอะไมเลสทนร้อน 0.1 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำเดือด 30 นาที เขย่าทุก 5 นาที

4. กรองผ่าน Gooch Crucible P2 ที่บรรจุ celite 0.5 กรัม

5. ล้างขวดรูปชมพู่ด้วยน้ำกลั่นร้อน 10 มิลลิลิตรให้สะอาด และกรองผ่าน Gooch Crucible ล้างตะกอนด้วยน้ำร้อน 5 มิลลิลิตร กรองอีกครั้ง

6. รวบรวมส่วนที่กรองได้ใส่ขวดชมพู่ 125 มิลลิลิตร เติม 2.0 โมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.5 ปริมาณ 2 มิลลิลิตร และ เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที

7. เติม 2.0 โมลาร์โซเดียมอะซิเตท 4 มิลลิลิตร และเอนไซม์โปรติเอส 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที

8. เติม 100 % ethanol 166 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และทิ้งให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง

9. กรองผ่าน Gooch Crucible P4 ล้างตะกอนด้วย 80% ethanol 20 มิลลิลิตร แล้วกรอง

10. ล้างตะกอนด้วย acetone 20 มิลลิลิตร

11. นำ Gooch Crucible P4 ที่มีตะกอนไปอบแห้งที่ 105 °C ข้ามคืน นำออกใส่ในเดสิกเคเตอร์ ปล่อยให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง นำไปชั่งน้ำหนัก (C_{1r})

12. นำ Gooch Crucible P4 ที่มีตะกอนที่อบแห้งแล้ว ไปทำการเผาที่ 525 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำออกใส่ในเดสิกเคเตอร์ ปล่อยให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง นำไปชั่งน้ำหนัก (C_{1a})

<u>การหาปริมาณเส้นใยที่ไม่ละลาย (Insoluble fiber)</u>

1. ชั่งตัวอย่างน้ำหนักที่แน่นอน 2.5 กรัม (S_2) ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร เติม neutral detergent solution 100 มิลลิลิตร และเติมเอนไซม์แอลฟลาอะไมเลสทนร้อน 0.1 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดภายใน 5-10 นาที และต้มทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

2. กรองผ่าน Gooch Crucible P2 ล้างตะกอนด้วยน้ำร้อน 100 มิลลิลิตร

3. วาง Gooch Crucible P42 ที่มีตะกอนวางในบีกเกอร์ที่มีขนาดพอดีที่ใส่ Gooch Crucible P2 ได้

4. เติมน้ำ 15 มิลลิลิตร และเติมเอนไซม์แอลฟลาอะไมเลสที่ไม่ทนร้อน 10 มิลลิลิตร บ่มไว้ 5 นาที กรองส่วนใสทิ้ง

5. วาง Gooch Crucible P42 ที่มีตะกอนวางในบีกเกอร์ที่มีขนาดพอดีที่ใส่ Gooch Crucible P2 ได้

6. และเติมน้ำร้อน 15 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์แอลฟลาอะไมเลสที่ทนร้อน 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 55 °C ไว้ นาน 1 ชั่วโมง กรองส่วนใสทิ้ง และล้างด้วยน้ำร้อน 100 มิลลิลิตร

7. ล้างตะกอนด้วย acetone 20 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

8. นำ Gooch Crucible P24 ที่มีตะกอนไปอบแห้งที่ 105 °C ข้ามคืน นำออกใส่ในเดสิกเคเตอร์ ปล่อยให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง นำไปชั่งน้ำหนัก (C_{2r})

9. นำ Gooch Crucible P2 ที่มีตะกอนที่อบแห้งแล้ว ไปทำการเผาที่ 525 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำออกใส่ในเดสิกเคเตอร์ ปล่อยให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง นำไปชั่งน้ำหนัก (C_{2a})

ปริมาณเส้นใยอาหาร = ปริมาณเส้นใยที่ละลายได้ + ปริมาณเส้นใยที่ไม่ละลาย

$$= \{[(C_{1r} - C_{1a} - B) / S_1] + [(C_{2r} - C_{2a}) / S_2]\} \times 100$$

โดยที่ B คือ แบลงค์ที่ไม่มีตัวอย่าง