ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ก1. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen)

อุปกรณ์

1. เครื่องกลั่นโปรตีน
2. หลอดย่อยโปรตีน ขนาด 250-300 มิลลิลิตร
3. เตาย่อยโปรตีน
4. บิวเรตขนาด 25 มิลลิลิตร
5. ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
2. สารเร่งปฏิกิริยา : คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) 1 ส่วน ต่อ โปแตสเซียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (K_2SO_4) 9 ส่วน
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักโดยปริมาตร)
4. สารละลายกรดเกลือ (HCl) เข้มข้น 0.1 นอร์มอล
5. สารละลายกรดบอริก (H_3BO_3) เข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักโดยปริมาตร)
6. สารละลายมิกซ์อินดิเคเตอร์ : นำเมทิลเรด (methyl red) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ผสมกับโบรโมครีซอลกรีน (bromocresol green) ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ในสารละลายเอธานอลควมเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาณ 200 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลิลิตร ใส่ในหลอดย่อยโปรตีน
2. เติมสารเร่งปฏิกิริยาปริมาณ 5 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 40 มิลลิลิตร
3. นำไปย่อยบนเตาย่อยโปรตีนประมาณ 45 นาที จนได้สารละลายสีฟ้าใส
4. ทิ้งไว้ให้เย็นและเติมน้ำกลั่นปริมาณ 75 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
5. จัดอุปกรณ์กลั่น
6. นำขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร และเติมสารละลายกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักโดยปริมาตร) 25 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และเติม มิกซ์อินดิเคเตอร์ 2-3 หยด แล้วนำมารองรับ

ของเหลวที่กลั่นได้โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มอยู่ในสารละลายกรด ให้ความร้อนจน แอมโมเนีย (NH_3) ถูกกลั่นจนหมด

7. นำขวดรูปชมพู่ออกแล้วล้างปลายของอุปกรณ์ควบแน่นด้วยน้ำกลั่นลงในขวด แล้วไตเตรทสารละลายที่กลั่นได้ด้วนสารละลายกรดเกลือเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนกระทั่งจุดยุติเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงปนเทา

8. ทำ blank ด้วยวิธีการเช่นเดียวกันตั้งแต่ข้อ 2-7

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด} = \frac{(v-b) \times N \times 14.007}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)}}$$

โดยที่

v = ปริมาณสารละลายกรดเกลือที่ใช้ (มิลลิลิตร)

b = ปริมาณสารละลายกรดเกลือที่ใช้กับ blank (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายเกลือ (นอร์มอล)

14.0007 = น้ำหนักสมมูลย์ของไนโตรเจน

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

ข1. การวิเคราะห์ปริมาณ *Clostridium perfringens* โดย Pour Plate Technique (ISO, 2004)

อุปกรณ์

1. ตู้บ่มเพาะเชื้อ ช่วงใช้งานอุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส
2. อ่างควบคุมอุณหภูมิ ช่วงการใช้งานอุณหภูมิ 45 ± 1 องศาเซลเซียส และ 46 ± 0.5 องศาเซลเซียส
3. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
4. เครื่องชั่ง 2 และ 3 ตำแหน่ง
5. เครื่องเขย่าไฟฟ้า (Vortex mixer)
6. Anaerobic jar พร้อม Gas pack
7. อุปกรณ์เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Presumptive test
   - 1.1 Phosphate buffer
   - 1.2 Egg-york-free TSC agar หรือ Sulfite -cycloserine agar
   - 1.3 D –cycloserine solution
2. Confirmation test
   - 2.1 Fluid thioglycollate medium
   - 2.2 Lactose sulfite medium (Base medium)
   - 2.3 Disodium disulfite solution
   - 2.4 Ammonium iron (III) citrate solution

การเตรียมอุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. <u>Tryptose Sulfite –cycloserine medium</u>
   - 1.1 TSC agar base
     - 1.1.1 ละลายผง TSC agar ในน้ำกลั่นตามสัดส่วนที่ผู้ผลิตกำหนดแล้วนำไปต้มให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

1.1.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.1.3 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 1 ถึง 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 2 สัปดาห์ หลังจากเตรียม

1.2 D-cycloserine solution

1.2.1 ละลาย D-cycloserine 4.0 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วฆ่าเชื้อโดยการกรอง

1.2.2 เก็บรักษาที่1 ถึง 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 4 สัปดาห์ หลังจากเตรียม

1.3 Complete medium

1.3.1 ก่อนทำการใช้ TSC agar เติม D-cycloserine solution ลงใน TSC agar base ที่หลอมละลายแล้วและมีอุณหภูมิประมาณ 44-47 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน D-cycloserine solution 1 มิลลิลิตร ต่อ TSC agar base 100 มิลลิลิตร

1.4 Fluid thioglycollate medium

1.4.1 ละลายผง Fluid thioglycollate medium ลงในน้ำกลั่นตามสัดส่วนที่ผู้ผลิตกำหนด แล้วนำไปต้มให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

1.4.2 แบ่งใส่ฝาเกลียวหลอดละ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และต้องทำการต้มไล่อากาศก่อนนำไปใช้

1.5 Lactose sulfite medium (LS)

1.5.1 Base medium

1.5.1.1 ส่วนประกอบ

-	Enzymatic digest of casein	5.0 กรัม
-	Yeast extract	2.5 กรัม
-	Sodium chloride	2.5 กรัม
-	Lactose	10.0 กรัม
-	L-Cysteine hydrochloride	0.3 กรัม

1.5.2 ละลายสารประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่หลอดทดลองพร้อมหลอดดักก๊าซ หลอดละ 8 มิลลิลิตร

1.5.3 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 3 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 4 สัปดาห์

1.6 Disodium disulfite solution

1.6.1 ละลาย Disodium disulfite anhydrous 1.2 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วฆ่าเชื้อโดยการกรอง สารละลายสามารถใช้ได้ไม่เกิน 1 วัน

1.7 Ammonium iron (III) citrate solution

1.7.1 ละลาย Ammonium iron (III) citrate solution 1.0 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วฆ่าเชื้อโดยการกรอง สารละลายสามารถใช้ได้ไม่เกิน 1 วัน

1.8 Complete medium

เติม Disodium disulfite solution 0.5 มิลลิลิตร และ Ammonium iron (III) citrate solution 0.5 มิลลิลิตร ลงใน Base medium สารละลายสามารถใช้ได้ไม่เกิน 1 วัน

วิธีการ

1. Presumptive test

1.1 การเตรียมตัวอย่าง

- กรณีตัวอย่างเป็นของเหลว

นำตัวอย่างใส่ลงผสมกันในขวดที่ฆ่าเชื้อแล้ว เขย่าอย่างน้อย 50 ครั้ง ดูดตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในถุง Stomacher เติม Maximal-Recovery Diluent 225.0 มิลลิลิตร นำไปตีให้ตัวอย่างกระจายด้วยเครื่องตีตัวอย่าง เป็นเวลา 1 นาที จะได้ความเข้มข้นของตัวอย่าง 0.1 กรัม/มิลลิลิตร

เตรียมความเข้มข้นต่อไป โดยการดูดสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.1 กรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่มี Maximal-Recovery Diluent 9.0 มิลลิลิตร แล้วทำการเขย่าด้วย Vortex ให้ตัวอย่างกระจายสม่ำเสมอทั่วหลอด จะได้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 0.01 กรัม/มิลลิลิตร ทำซ้ำต่อไปจนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

1.2 การเพาะเชื้อเพื่อดูลักษณะโคโลนี

ดูดตัวอย่างความเข้มข้นละ 2.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นเท TSC agar ที่เก็บใน water bath อุณหภูมิ 44-47 องศาเซลเซียส ลงไปประมาณ 10-15 มิลลิลิตร แล้วทำการวนจานเพาะเชื้อจนสารละลายตัวอย่างกระจายทั่ว ทิ้งไว้ให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง แล้วเททับด้วย SC agar อีก 10 มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้ให้แข็งที่อุณหภูมิห้อง

เมื่อ TSC agar แข็งตัวแล้วกลับจานเพาะเชื้อใส่ลงใน Anaerobic jar ที่มีตัวทำให้เกิดสภาวะปราศจากออกซิเจน พร้อมทั้งแผ่นทดสอบสภาพปราศจากออกซิเจน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 20 ± 2 ชั่วโมง จากนั้น เมื่อครบกำหนดเวลา นำออกจากตู้บ่ม สังเกตที่แผ่นทดสอบจะต้องแสดงสภาวะปราศจากออกซิเจน นับจำนวนโคโลนีที่มีสีดำจากจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีสีดำน้อยกว่า 150 โคโลนี จดบันทึกจำนวนโคโลนีที่นับได้ในแต่ละความเข้มข้น

1.3 การเตรียมเชื้อเพื่อทดสอบยืนยันผล

เลือกโคโลนีที่มีสีดำ 5 โคโลนี หรือต่ำกว่าในกรณีที่มีเชื้อขึ้นต่ำกว่า 5 โคโลนี ใส่ลงใน Fluid thioglycollate medium หลอดละ 1 โคโลนี แล้วนำไปบ่มในสภาวะไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง

2. Confirmed test

หลังจากบ่มครบตามเวลาที่กำหนดแล้วนำมาใส่ลงใน LS medium 5 หยด โดยใช้ปิเปตปราศจากเชื้อและทำอย่างรวดเร็ว แล้วนำไปบ่มใน water bath อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง หลังจากครบกำหนดแล้วพิจารณาผลการทดสอบดังนี้

คุณสมบัติ	**ลักษณะ**	***C.perfringens***
การสร้างแก๊สจากการย่อย Lactose	มีแก๊สในหลอด Durham มากกว่า ¼ ของหลอด	+
การสร้างตะกอน iron sulfite	มีตะกอนสีดำ	+

สำหรับหลอด LS medium ที่มีตะกอนสีดำแต่มีแก๊สไม่ถึง ¼ ของหลอด Durham ให้ถ่ายลง LS medium หลอดใหม่ 5 หยด โดยใช้ปิเปตปราศจากเชื้อและทำอย่างรวดเร็วแล้วนำไปบ่มใน water bath อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง แล้วนำออกมาพิจารณาผลใหม่อีกครั้ง

การคำนวณ

$$\text{จำนวนโคโลนี (CFU/มิลลิลิตร)} = \frac{p}{n} \times \Sigma C \times d$$

p = จำนวนโคโลนีที่ทดสอบยืนยันผลให้ผลบวก

n = จำนวนโคโลนีทั้งหมดที่เลือกมาทดสอบยืนยันผล

ΣC = ผลรวมของโคโลนีทั้งหมดทุกจานเพาะเชื้อที่นับได้

D = ระดับความเจือจางที่ทำการนับโคโลนีได้

ภาคผนวก ค

การทดสอบทางประสาทสัมผัส

ค1. แบบทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของน้ำปลาที่แต่ละสูตรการหมัก

ผลิตภัณฑ์……..……..... วันที่……..……

ชื่อ…….....

คำแนะนำ กรุณาพิจารณาตัวอย่างที่เสนอให้จากซ้ายมือไปขวามือแล้วทำเครื่องหมายถูก (√) ตัวอย่างในแต่ละปัจจัยที่ใกล้เคียงกับความรู้สึกของท่านมากที่สุด

เกณฑ์การให้คะแนน

ลักษณะที่ตรวจสอบ	เกณฑ์ที่กำหนด	ระดับการตัดสินใจ	ตัวอย่าง		
			1	2	3
ลักษณะทั่วไป	ต้องใส ปราศจากตะกอน ยกเว้นผลึกซึ่งเกิดตามธรรมชาติ	ดีมาก(4)			
		ดี (3)			
		พอใช้ (2)			
		ต้องปรับปรุง (1)			
สี	ต้องมีสีที่ดีตามธรรมชาติของน้ำปลาพื้นบ้าน	ดีมาก(4)			
		ดี (3)			
		พอใช้ (2)			
		ต้องปรับปรุง (1)			
กลิ่นรส	ต้องมีกลิ่นที่ ดีตามธรรมชาติ ของน้ำปลาพื้นบ้าน ปราศจากกลิ่นอื่นที่ไม่พึงประสงค์ เช่น กลิ่นเน่า กลิ่นคาว	ดีมาก(4)			
		ดี (3)			
		พอใช้ (2)			
		ต้องปรับปรุง (1)			
รส	ต้องมีรสที่ดีตามธรรมชาติของน้ำปลาพื้นบ้าน	ดีมาก(4)			
		ดี (3)			
		พอใช้ (2)			
		ต้องปรับปรุง (1)			

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

ค2. แบบทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของน้ำปลาที่ปรุงรสด้วยน้ำตาลทรายที่แต่ละความเข้มข้น

ชื่อผู้ทดสอบ .....วันที่ทดสอบ .....

คำแนะนำ กรุณาชิมตัวอย่างน้ำปลาพื้นบ้านที่จัดให้จากซ้ายไปขวาแล้วให้คะแนนระดับความพึงพอใจของท่านในแต่ละปัจจัยดังตารางด้านล่าง

ระดับความพึงพอใจ

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

ลักษณะทางประสาทสัมผัส	**คะแนน**				
	สูตรที่ 1	**สูตรที่ 2**	**สูตรที่ 3**	**สูตรที่ 4**	**สูตรที่ 5**
ลักษณะทั่วไป					
สี					
กลิ่นรส					
ความชอบโดยรวม					

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

****

ค3. แบบสำรวจความต้องการของผู้บริโภคต่อการพัฒนาบรรจุภัณฑ์ของผลิตภัณฑ์น้ำปลาพื้นบ้าน

ชื่อ-สกุล .....วันที่ .....

คำชี้แจง กรุณาทำเครื่องหมายถูก (√) ลงในช่องที่ตรงกับคำตอบและความคิดเห็นของท่านมากที่สุด

1. ท่านคิดว่าชนิดของบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับบรรจุและเก็บรักษาน้ำปลาพื้นบ้านคืออะไร

1.1) ☐ แก้ว 1.2) ☐ พลาสติก

2. ท่านคิดว่าปริมาณน้ำปลาที่เหมาะสมสำหรับการบรรจุเพื่อจำหน่ายต่อหนึ่งหน่วยควรมีขนาดเท่าใด

2.1) ☐ 60 มิลลิลิตร (ขนาดเล็ก)

2.2) ☐ 200 มิลลิลิตร (ขนาดกลาง)

2.3) ☐ 700 มิลลิลิตร (ขนาดใหญ่)

3. ท่านคิดว่าราคาจำหน่ายน้ำปลาพื้นบ้านจากวัสดุเศษเหลือในกระบวนการผลิตปลาดุกร้าต่อหนึ่งหน่วยควรเป็นเท่าใด

3.1) ☐ 5-15 บาท

3.2) ☐ 16-25 บาท

3.3) ☐ 26-35 บาท

4. ท่านคิดว่าสีฉลากผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์น้ำปลาพื้นบ้านควรเป็นโทนสีใด

4.1) ☐ โทนสีแดง

4.2) ☐ โทนสีเหลือง

4.3) ☐ โทนสีน้ำเงิน

****

ขอบคุณสำหรับความร่วมมือในการตอบแบบสอบถาม

วิทยาลัยภูมิปัญญาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ

ค4. แบบทดสอบความพึงพอใจของผู้บริโภคที่มีต่อฉลากผลิตภัณฑ์น้ำปลาพื้นบ้าน

ชื่อผู้ทดสอบ .....วันที่ทดสอบ .....

คำแนะนำ กรุณาพิจารณาฉลากผลิตภัณฑ์น้ำปลาพื้นบ้านแต่ละรูปแบบ แล้วให้คะแนนระดับความพึงพอใจของท่านในแต่ละปัจจัยดังตารางด้านล่าง

ระดับความพึงพอใจ

1 = ปรับปรุง 2 = น้อย 3=ปานกลาง 4 = ดี 5 = ดีมาก

ปัจจัยพิจารณา	**คะแนน**		
	ฉลากที่ 1	**ฉลากที่ 2**	**ฉลากที่ 3**
1. รูปทรงสวยงาม			
2. ความเหมาะสมของขนาดและสัดส่วน			
3. ความเหมาะสมของสี ตัวอักษร และรูปภาพ			
4. ความสะดุดตา			
5. ความเป็นเอกลักษณ์			

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....