

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

ภาคผนวก จ-1 ปริมาณน้ำอิสระ (Water activity)

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่อง Water activity A_w (A_w Sprint Novasina TH-500, Switzerland)

2. วิธีการวิเคราะห์

2.1 นำตัวอย่างที่ต้องการวัด มาบดละเอียด ใส่ลงใน Can สำหรับการวัด Water activity

2.2 เปิดเครื่องและรอให้เครื่อง Warm จนกว่าจะขึ้นคำว่า NOVASINA จึงเริ่มทำการวัด

ตัวอย่าง

2.3 ใช้คีบคีบ นำตัวอย่างใส่ลงในเครื่อง ปิดฝาเครื่องวัดให้สนิทแล้วกดปุ่ม Start ค้างไว้

2.4 ที่ตัวเครื่องจะไฟสีเหลืองกระพริบขึ้นที่ Analyzing รอให้เครื่องวัดตัวอย่างจนกระทั่งไฟสีเหลืองเปลี่ยนมาขึ้นที่คำว่า Ok

2.5 บันทึกค่า Water activity ที่เครื่องวัดได้

ภาคผนวก จ-2 การวัดค่าสี ($L^*a^*b^*$)

การวัดสีของตัวอย่างจะวัดด้วยเครื่องวัดค่าสี HPG 2132 Portable Colorimeter การวัดสีโดยระบบสีของ (Hunter system) ระบบสีของฮันเตอร์ ประกอบด้วยตัวแปรของสี 3 ตัว คือ L^* และ b^* ซึ่งมีความหมายดังนี้

L^* คือ ค่าความแตกต่างของสี ซึ่งมีค่าจาก 0 คือ สีดำ ถึง 100 คือ สีขาว

a^* คือ ค่าที่บ่งบอกความเป็นสีเขียวและสีแดงที่อยู่ในตัวอย่าง โดยค่า a^+ แสดงถึงความเป็นสีแดง ค่า a^- แสดงถึงความเป็นสีเขียว

b^* คือ ค่าที่บ่งบอกความเป็นสีเหลืองและสีน้ำเงิน ที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยค่า b^+ แสดงถึงความเป็นสีเหลือง ค่า b^- แสดงถึงความเป็นสีน้ำเงิน

วิธีการวัดค่าสี

1. ก่อนทำการวัดสีทุกครั้งต้องทำการปรับมาตรฐานเครื่อง (Calibration) โดยการวางหัววัดทาบบนผิวหน้าของแผ่น Calibrate สีขาวกดปุ่ม Measure ให้เครื่องวัดค่าสี เครื่องวัดสีจะบันทึกข้อมูลของแผ่น Calibrate สีขาวไว้

2. ทำการวัดสีตัวอย่างผลิตภัณฑ์ วัดตัวอย่างประมาณ 50 มิลลิลิตร นำหัววัดทาบบนผิวหน้าของตัวอย่างแล้วกดปุ่ม Measure ให้เครื่องวัดอ่านค่าสี จดบันทึกข้อมูล

ภาคผนวก จ-2 การหาค่าการพองตัว (Swelling power) และการละลาย (Solubility)

ของแป้ง (ดัดแปลงจากวิธีของ Schoch, 1964)

1. ชั่งตัวอย่างแป้ง 0.3-0.5 กรัม โดยคิดเป็นน้ำหนักแป้งแห้ง (จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (A) นำตัวอย่างแป้งใส่ในหลอดเหวี่ยงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.50 เซนติเมตร (ซึ่งน้ำหนักหลอดเหวี่ยงให้ทราบน้ำหนักแน่นอน) เติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร
2. แช่ในอ่างน้ำร้อนที่ควบคุมอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส กวนตลอดเวลาเป็นเวลา 30 นาที
3. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วย Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2,200 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที
4. ดูดส่วนใสตอนบนใส่ Moisture can ที่ทราบน้ำหนัก (ต้องนำ Moisture can ไปอบแห้ง แล้วนำมาใส่ Desiccators ให้เย็น) แล้วจึงชั่งน้ำหนัก โดยดูดน้ำส่วนใสให้มากที่สุด และนำไปอบแห้ง ในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส อบจนกระทั่งแห้ง (นำใส่ Desiccators ทิ้งให้เย็นแล้ว ชั่งน้ำหนัก จนน้ำหนักคงที่ ถ้ายังไม่คงที่ให้นำไปอบอีก 10 นาที) จนได้น้ำหนักเท่ากันตลอด จดบันทึก น้ำหนักไว้ ลบน้ำหนักของ Moisture can ออก เป็นค่าน้ำหนักส่วนที่ละลายน้ำ (B)
5. ส่วนแป้งเปียกที่อยู่ในหลอด นำไปชั่งน้ำหนักทั้งหลอดแล้วหักลบน้ำหนักหลอดออกเป็น น้ำหนักแป้งที่พองตัวแล้ว (C)

คำนวณ

$$\% \text{ การละลาย} = \frac{\text{น้ำหนักแป้งส่วนที่ละลายน้ำ (B)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแป้งเริ่มต้น (A)}}$$

$$\text{การพองตัว} = \frac{\text{น้ำหนักแป้งที่พองตัวแล้ว (C)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแป้งแห้งเริ่มต้น (A)} \times (100 - \% \text{ การละลาย})}$$

ภาคผนวก จ-3 การวัดค่าความหนืด (Brookfield viscometer)

1. ปรับระดับลูกน้ำด้านบนของเครื่องให้อยู่ในวงกลม โดยการปรับที่ขาตั้งทั้ง 3 มุมของฐาน
2. เปิดสวิตช์ Power on
3. รอจนหน้าจอแสดงผลโชว์ Remove spindle/ Press and key เอาเข็มออกจากตัวเครื่อง
4. กดปุ่มใดปุ่มหนึ่งที่หน้าจอ เครื่องจะโชว์ Autozeroing viscometer ซึ่งเครื่องจะปรับศูนย์อัตโนมัติ รอประมาณ 15 วินาทีจนเครื่องโชว์ Replace spindle / Press and key และกดปุ่มใดปุ่มหนึ่งอีกครั้ง

5. ใส่ Guard leg และเข็ม (Spindle) โดยหมุนตามเข็มนาฬิกา จุ่มเข็มลงในสารตัวอย่าง จนถึงรอย Mark ถ้าเข็มเป็น Disc spindle ให้เอียงเข็ม 45 องศาเซลเซียส จุ่มลงในสารตัวอย่าง แล้วใส่เข็มติดกับเครื่อง ระวังอย่าให้มีฟองอากาศอยู่ใต้ Disc spindle

6. ใส่รหัสของเข็มที่จะใช้งาน โดย

- กดปุ่ม Select spindle
- กดปุ่มลูกศรขึ้น-ลง เพื่อเลือกรหัสเข็มที่จะใช้
- กดปุ่ม Select spindle อีกครั้ง เมื่อได้รหัสเข็มที่ต้องการ (ภายใน 3 วินาที)

7. เลือกความเร็วที่จะใช้งาน โดย

- กดปุ่ม Motor on/off ที่จอแสดงผลจะโชว์ 0.0 RPM
- กดปุ่มลูกศรขึ้น-ลง เพื่อเลือกความเร็วรอบที่ต้องการ
- กดปุ่ม Set speed เมื่อได้ความเร็วรอบที่ต้องการ

8. อ่านค่าและบันทึกผล

สภาวะที่เหมาะสมในการวัดค่าความหนืด

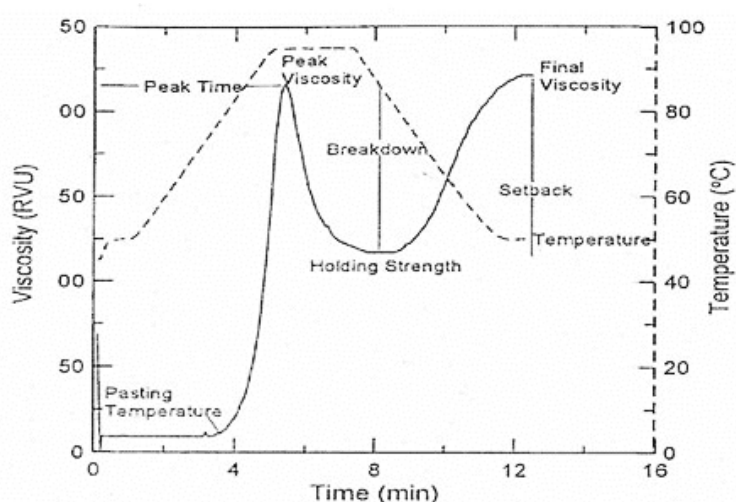
- เลือกเข็ม (Spindle) ให้เหมาะสม (ใช้เข็มเบอร์ 1 เหมาะสำหรับสารตัวอย่างที่มีความหนืดน้อยๆ และเบอร์มากขึ้นสำหรับสารตัวอย่างที่มีความหนืดมากขึ้น)
- เลือกความเร็ว (Speed) ให้เหมาะสม (ทดลองปรับเปลี่ยนค่าความเร็วหลายๆ ค่า) โดยดูที่ % สูงที่สุดเท่าที่จะทำได้ สารตัวอย่างบางอย่าง อาจวัดค่าได้แค่ 40% เท่านั้น และเลือกเข็มและความเร็วที่อ่านค่า % ได้สูงสุด

หมายเหตุ

- ภาชนะใส่สารตัวอย่างใช้บีกเกอร์ทรงเตี้ย ขนาด 600 มิลลิลิตร และใส่สารตัวอย่าง 500 มิลลิลิตร
- การเปลี่ยนค่าความเร็ว ให้กดลูกศร ขึ้น-ลง เลือกค่าใหม่ได้เลยโดยไม่ต้องปิดเครื่อง
- ในกรณีที่บนจอปรากฏ % EEE %? %--- แสดงว่าใช้หัวหมุนและความเร็วไม่เหมาะสม ให้กด Motor off แล้วรอให้เข็มหยุดหมุนแล้วจึงทำการเปลี่ยนหัวหมุนที่ใช้

ภาคผนวก จ-4 การวิเคราะห์ค่าความหนืดของน้ำแป้งด้วยเครื่อง Rapid visco analyzer (RVA)

นำตัวอย่างแป้งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Rapid visco analyzer (RVA) ใช้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของแป้ง 11% โดยใช้แป้งข้าวเจ้า 3 กรัม (ความชื้นร้อยละ 14) ผสมกับน้ำ 25 กรัม น้ำแป้งถูกให้ความร้อนที่อุณหภูมิเริ่มต้น 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 95 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราเร็ว 12.2 องศาเซลเซียสต่อนาที รักษาให้อุณหภูมิคงที่ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 2.7 นาที กวนด้วยอัตราเร็ว 160 รอบต่อนาที ต่อจากนั้นทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 12.2 องศาเซลเซียสต่อนาที เป็นเวลา 2.1 นาที บันทึกค่าต่างๆ ดังนี้



- (1) Peak time = เวลาที่เกิดจุดสูงสุด (Peak) ของความหนืด มีหน่วยเป็น นาที
- (2) Pasting temperature = อุณหภูมิที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงความหนืด หรือมีค่าความหนืดเพิ่มขึ้น 2 RVA ในเวลา 20 นาที มีหน่วยเป็น องศาเซลเซียส
- (3) Peak temperature = อุณหภูมิที่เกิดจุดสูงสุด (Peak) มีหน่วยเป็น องศาเซลเซียส
- (4) Peak viscosity = ความหนืดที่จุดสูงสุด มีหน่วยเป็น RVU
- (5) Trough = ความหนืดที่ต่ำที่สุดระหว่างการทำเย็น มีหน่วยเป็น RVU
- (6) Breakdown = ความแตกต่างระหว่างความหนืดสูงสุดกับความหนืดต่ำสุด มีหน่วยเป็น RVU
- (7) Final viscosity = ความหนืดสุดท้ายของการทดลอง มีหน่วยเป็น RVU
- (8) Setback from peak = ผลต่างของความหนืดสุดท้ายกับความหนืดสูงที่สุด มีหน่วยเป็น RVU
- (9) Setback from trough = ผลต่างของความหนืดสุดท้ายกับความหนืดต่ำสุด มีหน่วยเป็น RVU

ภาคผนวก จ
การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

ภาคผนวก ฉ-1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น AOAC (2007)

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1.1 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) รุ่น UL-60
- 1.2 ถ้วยหาความชื้นพร้อมฝาปิด (Moisture can)
- 1.3 โถดูดความชื้น (Desiccator)
- 1.4 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น TA4102
- 1.5 Tongs หรือ Forceps รุ่น F6010, USA

2. วิธีการวิเคราะห์

2.1 หาน้ำหนักที่คงที่ของถ้วยเปล่า นำเข้าตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง ทำให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักแล้วนำเข้าอบใหม่ ดำเนินการเหมือนครั้งแรก จนได้น้ำหนักคงที่และบันทึกค่า (น้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไปไม่มากกว่า 1 มิลลิกรัม)

2.2 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่แน่นอนจำนวน 2 กรัม (บันทึกค่า) ใส่ลงในถ้วยที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้วเกลี่ยตัวอย่างออกอย่างสม่ำเสมอให้มีเนื้อที่มากที่สุดที่จะทำได้

2.3 อบตัวอย่างในถ้วยหาความชื้นให้แห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2-4 ชั่วโมง ทำให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักแล้วนำตัวอย่างเข้าอบใหม่อีกครั้ง ครึ่งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักคงที่ (น้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไปไม่มากกว่า 1 มิลลิกรัม) บันทึกค่าน้ำหนักหลังอบที่แน่นอน

2.4 นำผลที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณความชื้นดังสมการต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \times 100$$

ภาคผนวก ฉ-2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน AOAC (2007)

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1.1 เครื่องวิเคราะห์โปรตีน KJELTEC 2200 ยี่ห้อ FOSS
- 1.2 หลอดย่อยโปรตีน ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 1.3 ชุดกลั่นโปรตีน
- 1.4 ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
- 1.5 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 1.6 บิวเรตต์ ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 1.7 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 1.8 กระดาษชำระ

2. สารเคมี

- 2.1 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น ถพ. 1.84, N₂-free
- 2.2 คอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO₄·5H₂O)
- 2.3 โพตัสเซียมซัลเฟต (K₂SO₄)
- 2.4 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 40
- 2.5 สารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก 0.10 นอร์มอล : HCl มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น ปริมาณ 1 ลิตร
- 2.6 สารละลายกรดคาร์บอนิกร้อยละ 4 เตรียมโดยใช้น้ำร้อน
- 2.7 Indicator: Methyl red 0.10 กรัม ผสมกับ Bromocresl green ปริมาณ 0.10 กรัม ในเอทานอล 100 มิลลิลิตร
- 2.8 โซเดียมไฮดรอกไซด์

3. วิธีการวิเคราะห์

- 3.1 ชั่งตัวอย่างลงในกระดาษชั่งสารให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 1 กรัม
- 3.2 เติมคอปเปอร์ซัลเฟต 0.80 กรัม และโพตัสเซียมซัลเฟต 7 กรัม
- 3.3 เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 12 มิลลิลิตร และเขย่าเบาๆ เพื่อให้ท่วมตัวอย่าง
- 3.4 ใส่หลอดย่อยใน Rack ปิดฝาหลอดย่อยด้วย Exhaust system เปิดสวิตช์ชุดจับไอกรด (Scrubber unit) เปิดสวิตช์เครื่องย่อย (Digester) ตั้งอุณหภูมิที่ 420 องศาเซลเซียส
- 3.5 ย่อยจนได้สารละลายสีฟ้าใสในตู้ดูดควัน (ใช้เวลาประมาณ 30-60 นาที) ยก Rack หลอดย่อยขึ้นพักไว้บน Stand (ยังไม่ต้องเปิดฝาหลอดย่อย) ทิ้งให้เย็น
- 3.6 นำขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ไปตั้งทิ้งไว้ที่ตำแหน่งรองรับของเครื่องกลั่น และเลื่อนฐานขึ้นให้ปลายแท่งแก้วจุ่มอยู่ใต้สารละลาย รองรับสิ่งที่กลั่นได้ด้วยสารละลายกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 25-30 มิลลิลิตร ที่ผสม Indicator ระหว่าง Methyl red 0.1 กรัม ผสมกับ Bromocresl green เรียบร้อยแล้ว
- 3.7 นำหลอดกลั่นใส่ให้ตรงกับหัวกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปิด Safety door เครื่องจะทำงานทันที (ก่อนจะเปิด Cooling bath ตั้งอุณหภูมิที่ 10-15 องศาเซลเซียส Warm เครื่องกลั่นด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง โดยไม่ต้องเติม NaOH และ Boric acid) และทำเช่นเดียวกันเมื่อเสร็จสิ้นการทดลองทุกครั้ง
- 3.8 กลั่นประมาณ 4 นาที (สารละลายใน Flask รองรับจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว) ล้างปลายอุปกรณ์ควบแน่นด้วยน้ำกลั่นลงใน Flask รองรับ
- 3.9 ทำการไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้กับสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก 0.10 นอร์มอล จนได้สีชมพู (จุดยุติ) บันทึกปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้
- 3.10 ทำ Blank ด้วยวิธีการเดียวกันตั้งแต่แรก

ภาคผนวก ฉ-3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน AOAC (2007)

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1.1 ชุดเครื่องมือและอุปกรณ์เครื่อง Soxtec Avanti 2050 Auto System
- 1.2 หลอดบรรจุตัวอย่าง (Thimble) พร้อมจับ (Thimble holder)
- 1.3 ถ้วยสกัด (Extraction cup) พร้อมที่จับ (Extraction cup holder)
- 1.4 โกร่งบดสาร
- 1.5 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- 1.6 โถดูดความชื้น (Desiccator)

2. สารเคมี

- 2.1 เฮกเซน (จุดเดือดที่ 62-67 องศาเซลเซียส หรือปิโตรเลียมอีเทอร์ที่จุดเดือด 40-60 องศาเซลเซียส)

3. วิธีการวิเคราะห์

- 3.1 เปิดเครื่องทำน้ำเย็น (Cooling bath) ควบคุมอุณหภูมิที่ 12-15 องศาเซลเซียส
- 3.2 Warm เครื่อง Soxtec โดยกดเปิดปุ่ม Power ปรับอุณหภูมิ และตั้งโปรแกรมการทำงานตามชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ ถ้าใช้ Hexane (Over temp. = 210 °C, Hot plate = 155 °C, Boiling time = 45 min, Rinse = 15 min, Recovery = 15 min, Pre-drying = 30 min) ถ้าใช้ Petroleum (Over temp. = 210 °C, Hot plate = 135 °C, Boiling time = 45 min, Rinse = 15 min, Recovery = 15 min, Pre-drying = 30 min)
- 3.3 Pre-heat hot plate โดยกดปุ่ม SSS
- 3.4 ชั่งตัวอย่างอาหารที่อบแห้งและบดละเอียดปริมาณ 1 กรัม (เทคนิค 4 ตำแหน่ง) ใส่ใน Thimble (ตัวอย่างที่มีความชื้น นำไปอบให้แห้งใน Hot air oven ที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที)
- 3.5 นำ Thimble มาใส่ในตัวเครื่อง Soxtec ด้วย Thimble holder
- 3.6 เติมตัวทำละลายประมาณ 50 มิลลิลิตรลงใน Extraction cup ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน (ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส, 2 ชั่วโมง) นำไปต่อเข้ากับ Condenser
- 3.7 กดที่ปุ่ม Start 1 ครั้ง โดยตัวโปรแกรมจะเริ่มทำงานตั้งแต่ขั้นตอน Boiling จนถึงขั้นตอน Pre-drying
- 3.8 เมื่อครบเวลาการทำงาน นำ Extraction cup อบใน Hot air oven ที่อุณหภูมิ 100±3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จนมีน้ำหนักคงที่
- 3.9 ระบายตัวทำละลายออกจากเครื่อง ใส่ในขวดตัวทำละลายที่ใช้แล้ว
- 3.10 คำนวณหาปริมาณไขมันที่สกัดได้ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณไขมันของตัวอย่าง (ร้อยละ)} = \frac{100 (w_1 - w_2)}{w}$$

โดย w_1 = น้ำหนักของ Extraction cup และน้ำหนักไขมันที่สกัดได้ภายหลังการอบแห้งแล้ว (กรัม)
 w_2 = น้ำหนักของ Extraction cup ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (กรัม)
 w = น้ำหนักของตัวอย่างอาหาร (กรัม)

ภาคผนวก จ-4 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า AOAC (2007)

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1.1 Crucible or Porcelain dish (ถ้วยกระเบื้องเคลือบ)
- 1.2 Desiccator
- 1.3 Electric muffle furnace
- 1.4 Electric burner
- 1.5 Hot air oven
- 1.6 Tong

2. วิธีการวิเคราะห์

- 2.1 อบ Crucible ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของ Crucible
- 2.2 ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของตัวอย่างปริมาณ 4-6 กรัม ใส่ลงไปใน Crucible แล้วนำไปเผาไฟอ่อนๆ บน Electric burner จนหมดควัน
- 2.3 นำตัวอย่างที่ได้ไปเผาในเตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 550 ± 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง จนกระทั่งได้เถ้าสีขาวหรือเทา (ถ้ายังเป็นสีดำให้นำออกมาหยดน้ำกลั่นลงไปให้ท่วมแล้วเผาต่อจนกระทั่งได้เถ้าสีขาว)
- 2.4 นำออกมालดอุณหภูมิใน Hot air oven ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาใส่ใน Desiccator ทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้องแล้วนำไปชั่ง เเผตัวอย่างซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 1 มิลลิกรัม จากนั้นนำมาคำนวณหาเถ้าด้วยสมการดังนี้

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

โดย W_1 = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบและตัวอย่างก่อนเผา (กรัม)
 W_2 = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบและตัวอย่างหลังจากเผาจนได้น้ำหนักคงที่ (กรัม)
 W = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ (กรัม)

ภาคผนวก จ-5 การวิเคราะห์ปริมาณใยอาหาร AOAC (2007)

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1.1 Hot extraction
- 1.2 Cold extraction
- 1.3 Cyclotec sample mill
- 1.4 Drying oven
- 1.5 Muffle furnace
- 1.6 เครื่องชั่งละเอียด
- 1.7 Crucible สำหรับกรองทำจาก Borosilicate glass
- 1.8 Desiccator

2. สารเคมี

- 2.1 H_2SO_4 1.25%
- 2.2 NaOH 1.25%
- 2.3 Acetone
- 2.4 น้ำกลั่นร้อน
- 2.5 Celite

3. วิธีการวิเคราะห์

3.1 ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัม ชั่งใน Celite 1 กรัม เพื่อช่วยในการกรองแล้วนำเข้าเครื่อง Fiber extraction unit ในส่วน Hot extraction

3.2 Hot extraction step 1 : วาง Crucible ในช่องเติม H_2SO_4 1.25% ที่ร้อนประมาณ 150 มิลลิลิตร และหยด Octanol 2-4 หยด เพื่อป้องกันการ Foaming ต้มให้เดือด และจับเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ร้อน 30 มิลลิลิตร 3 ครั้ง แต่แต่ละครั้งต้องระบายน้ำออกด้วย

3.3 Hot extraction step 2 : เติม NaOH 1.25% ที่ร้อน 150 มิลลิลิตร และหยด Octanol 2-3 หยด เพื่อป้องกันการ Foaming ต้มให้เดือด และจับเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ร้อน 30 มิลลิลิตร 3 ครั้ง แต่แต่ละครั้งต้องระบายน้ำออกด้วย

3.4 นำ Crucible เข้า Cold extraction เติม Acetone 25 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที กรองแล้วทำซ้ำอีกครั้ง

3.5 นำ Crucible เข้า Hot air oven เพื่อระเหย Solvent และ Dry crucible ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำ Crucible มาเข้า Furnace ที่อุณหภูมิ 525 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาลดอุณหภูมิให้ได้ ประมาณ 250 องศาเซลเซียส ใน Hot air oven จากนั้นนำมาเข้า Desiccator และชั่งน้ำหนัก

3.6 จากนั้นนำมาคำนวณหาปริมาณใยอาหารดังสมการต่อไปนี้

$$\text{Crude fiber (\%)} = \frac{W_2 - W_3}{W_1} \times 100$$

โดย W_1 = น้ำหนักตัวอย่าง

W_2 = น้ำหนัก Crucible + น้ำหนักตัวอย่างก่อน

W_3 = น้ำหนัก Crucible + น้ำหนักตัวอย่างหลัง

ภาคผนวก ฉ-6 การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรต

คำนวณจากสูตร ร้อยละคาร์โบไฮเดรต = $100 - \text{ร้อยละ(ความชื้น+โปรตีน+ไขมัน+เส้นใย+เถ้า)}$

ภาคผนวก ฉ-7 การวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลส โดยวิธี Juliano (1971)

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1.1 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
- 1.2 เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า
- 1.3 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 1.4 เครื่องสับผสม
- 1.5 ตะแกรงร่อนขนาด 100 mesh
- 1.6 ขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
- 1.7 Volumetric pipette ขนาด 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร
- 1.8 ปิเปตขนาด 1-10 มิลลิลิตร

2. สารเคมี

- 2.1 สารละลายเอทานอล ร้อยละ 95
- 2.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์
- 2.3 สารละลายกรดอะซิติก เข้มข้น 1 โมลาร์
- 2.4 สารละลายไอโอดีน (ไอโอดีน 0.20 กรัม และโปแตสเซียมไอโอไดด์ 2 กรัม

ในสารละลาย 100 มิลลิลิตร)

- 2.5 อะไมโลสบริสุทธิ์

3. วิธีการ

การเตรียมสารละลายมาตรฐานอะไมโลส

1. ชั่งอะไมโลสบริสุทธิ์ปริมาณ 0.04 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ อย่าให้อะไมโลสเกาะผนังขวด

3. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร
4. กวนของเหลวในขวดด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า นาน 10 นาที
5. นำแท่งแม่เหล็กออก และล้างส่วนที่ติดมากลับไปในขวดด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตร เป็น 100 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายเข้ากัน

การวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. ปิเปตสารละลายจากการเตรียมตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำกลั่นประมาณ 70 มิลลิลิตร
3. ปิเปตสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
4. ปิเปตสารละลายไอโอดีน 2 มิลลิลิตร
5. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 20 นาที
6. ทำ Blank เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่างแต่ไม่ใส่สารตัวอย่าง
7. วัดความเข้มสีของสารละลายโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วัดค่าการดูดกลืนของแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร โดยปรับค่าสารละลาย Blank เท่ากับ 0
8. นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปหาปริมาณอะไมโลส โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. ปิเปตสารละลายจากการเตรียมสารละลายมาตรฐานอะไมโลสปริมาตร 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำกลั่น ประมาณ 70 มิลลิลิตร
3. ปิเปตสารละลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดที่มีสารละลายมาตรฐาน ตามลำดับ
4. ปิเปตสารละลายไอโอดีนปริมาณ 2 มิลลิลิตร
5. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที
6. วัดความเข้มสีของสารละลายโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และเขียนกราฟระหว่างปริมาณอะไมโลส (กรัม/แป้งข้าว 100 กรัม คิดเป็นร้อยละ 8, 16, 24, 32 และ 40 กับค่าการดูดกลืนแสง)

ภาคผนวก ฉ-8 วัดค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH meter)

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1.1 เครื่อง pH meter (pH meter CyberScan PC510)

2. สารเคมี

- 2.1 น้ำกลั่น
- 2.2 สารละลายบัฟเฟอร์

3. วิธีการวิเคราะห์

- 3.1 ปรับมาตรฐานเครื่องวัดค่า pH โดยการปรับอิเล็กโทรดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์
- 3.2 ล้างอิเล็กโทรดด้วยน้ำกลั่น และเช็ดให้แห้ง
- 3.3 เติตัวอย่างที่ต้องการวัดใส่ลงในบีกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิลิตร โดยมีปริมาตรตัวอย่างประมาณ 3 ใน 4 ของบีกเกอร์
- 3.4 จุ่มอิเล็กโทรดลงในตัวอย่าง อ่านค่า pH ที่ได้ และบันทึกผล

ภาคผนวก ข
การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์

ภาคผนวก ข-1 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count)

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1.1 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)*
- 1.2 หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิด (Test tube) *
- 1.3 ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร*
- 1.4 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- 1.5 ตู้บ่มเชื้อ
- 1.6 หม้อนึ่งความดัน

หมายเหตุ : * จะต้องทำการอบฆ่าเชื้อในตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

- 2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar
- 2.2 Peptone

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) ปริมาณ 23.50 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายจนหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จะมีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0 ± 0.20 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมสารละลายสำหรับเจือจาง

ชั่งเปปโตนปริมาณ 25 หรือ 50 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 250 หรือ 500 มิลลิลิตร ตามลำดับ จะได้สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.10 ใช้ในการเจือจางตัวอย่าง

5. วิธีการวิเคราะห์

5.1 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) จะได้สารละลายตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 หรือ 10^{-1}

5.2 ใช้ปิเปตดูดสารละลายจากข้อ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) จะได้สารละลายตัวอย่างที่เจือจาง 1:100 หรือ 10^{-2} จนได้ระดับเจือจางของสารละลายตัวอย่างที่ต้องการ

5.3 ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่างๆ ลงในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร โดยในแต่ละระดับความเจือจางจะทำ 2 จาน โดยเริ่มจากระดับความเข้มข้นต่ำสุด

5.4 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่ยังเหลวอยู่ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อที่มีสารละลายตัวอย่าง ปริมาณจานละ 15-20 มิลลิลิตร ภายใน 1-5 นาที

5.5 ผสมสารละลายตัวอย่าง และอาหาร เลี้ยงเชื้อให้เข้ากันดี วางทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว จากนั้นคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อลง แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 3 ชั่วโมง

6. การตรวจนับโคโลนีและการรายงานผล

หลังจากบ่มจานเพาะเชื้อครบตามกำหนดเวลาแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี หาค่าจำนวนโคโลนีเฉลี่ยจากทั้งสองจานเพาะเชื้อรายงานการตรวจนับในหน่วยจำนวนโคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม (CFU/g)

ภาคผนวก ข-2 การวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และรา (Yeast and Mold)

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1.1 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)*
- 1.2 หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตรพร้อมฝาปิด (Test tube) *
- 1.3 ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร*
- 1.4 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- 1.5 ตู้บ่มเชื้อ
- 1.6 หม้อนึ่งความดัน

หมายเหตุ : * จะต้องทำการอบฆ่าเชื้อในตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

- 2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar
- 2.2 Peptone
- 2.3 สารละลายทาร์ทริกความเข้มข้นร้อยละ 10

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ปริมาณ 39 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายจนหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 3.5 โดยเติมสารละลายกรดทาร์ทริกความเข้มข้นร้อยละ 10 ลงไป (อาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร ใช้สารละลายทาร์ทริก 1.9 มิลลิลิตร)

4. การเตรียมสารละลายสำหรับเจือจาง

ชั่งเปปโตนปริมาณ 25 หรือ 50 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 250 หรือ 500 มิลลิลิตร ตามลำดับ จะได้สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ใช้ในการเจือจางตัวอย่าง

5. การเตรียมสารละลาย Tartaric acid 10%

ตวงปริมาตร Tartaric acid ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วนำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

6. วิธีการวิเคราะห์

6.1 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) จะได้สารละลายตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 หรือ 10^{-1}

6.2 ใช้ปิเปตดูดสารละลายจากข้อ 1. ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) จะได้สารละลายตัวอย่างที่เจือจาง 1:100 หรือ 10^{-2} จนได้ระดับเจือจางของสารละลายตัวอย่างที่ต้องการ

6.3 ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่างๆ ลงในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร โดยในแต่ละระดับความเจือจางจะทำ 2 จาน โดยเริ่มจากระดับความเข้มข้นต่ำสุด

6.4 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ยังเหลวอยู่ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อที่มีสารละลายตัวอย่าง ปริมาณจานละ 15-20 มิลลิลิตร ภายใน 1-5 นาที

6.5 ผสมสารละลายตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อเข้ากันดี วางทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว จากนั้นคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อลง จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ± 3 ชั่วโมง

7. การตรวจนับโคโลนีและการรายงานผล

หลังจากบ่มจานเพาะเชื้อครบตามกำหนดเวลาแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี หาค่าจำนวนโคโลนีเฉลี่ยจากทั้งสองจานเพาะเชื้อ รายงานการตรวจนับในหน่วยจำนวนโคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม (CFU/g)

ภาคผนวก ข-3 การหาปริมาณโคลิฟอร์มและอีโคไล (Coliform and *E. coli*)

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1.1 หลอดอาหาร (Test tube) พร้อมหลอดดักก๊าซ (Durham tube)
- 1.2 ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- 1.3 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Heating water bath, Gallenkamp, England)
- 1.4 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator, Gallenkamp, England)
- 1.5 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave, Gallenkamp, England)
- 1.6 เครื่องตีปั่น (Laboratory Blender Stomacher : Model 400, Seward Chemical., England)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

- 2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl sulphate broth (Difco™, USA.)
- 2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant green lactose bile broth ร้อยละ 2 (Difco™, USA.)
- 2.3 สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (Peptone, Difco™, USA.)

3. วิธีวิเคราะห์

- 3.1 การเตรียมตัวอย่าง
 - 3.1.1 เขย่าให้อาหารผสมเป็นเนื้อเดียวกันใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1:10 (10^{-1}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ด้วยเครื่องผสมแบบหมุนวน (Vortex) จะได้อาหารที่เจือจาง 1:100 (10^{-2})
- 3.2 การวิเคราะห์แบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโคลิฟอร์ม (Presumptive coliforms)
 - 3.2.1 ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างที่ระดับเจือจางต่างๆ (10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3}) ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl sulphate broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 ชุด ชุดละ 3 หลอด
 - ชุดที่ 1 ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 3 หลอด
 - ชุดที่ 2 ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 3 หลอด
 - ชุดที่ 3 ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-3} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 3 หลอด

3.2.2 บ่มหลอดเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง หากหลอดทดลองใดมีก๊าซเกิดขึ้นในหลอดดักก๊าซ แสดงว่าให้ผลเป็นบวก (Positive) ซึ่งคาดว่าจะมีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดโคลิฟอร์มเจริญอยู่ในตัวอย่างนั้น ถ้าไม่พบก๊าซในหลอดทดลองใด แสดงว่าให้ผลลบ (Negative) และไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดโคลิฟอร์มเจริญอยู่ในตัวอย่าง

3.2.3 การรายงานผลจำนวนโคลิฟอร์มในตัวอย่างที่เกิดก๊าซขึ้น จะต้องเปิดตารางแมคคราตี แล้วรายงานเป็นจำนวนโคลิฟอร์มแบคทีเรียต่อตัวอย่าง 1 กรัม

3.3 การยืนยันโคลิฟอร์ม

3.3.1 ใช้ห่วง (Loop) เชี่ยเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลบวก (Positive) จากการทดสอบแบคทีเรียที่คาดว่าจะโคลิฟอร์ม ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue agar ในจานเพาะเชื้อ

3.3.2 บ่มจานเพาะเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.3.3 ตรวจหาโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของโคลิฟอร์ม โดยโคโลนีของโคลิฟอร์มจะมีสีดำหรือสีดำตรงกลางล้อมรอบด้วยบริเวณที่โปร่งใสไม่มีสี โคลิฟอร์มบางโคโลนีมีลักษณะนูนเปี้ยกเยิ้ม

3.3.4 บันทึกจำนวนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชุดที่มีเชื้อจุลินทรีย์โคลิฟอร์มที่ได้รับการยืนยัน

ภาคผนวก ข-4 การตรวจวิเคราะห์สแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*)

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol salt egg-yolk agar (MSEY agar) หรือ Mannitol salt agar (MSA) หรือ Baird-Parker medium (MBP) ที่เตรียมและผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

1.2 Phosphate buffer solution (PBS) ในหลอดที่เตรียมและผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

1.3 Nutrient gelatin ในหลอดที่เตรียมและผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

1.4 Mannitol broth ในหลอดที่มีหลอดดักก๊าซบรรจุอยู่

1.5 Blood agar ในหลอดที่เตรียมและผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

1.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.7 ตัวอย่างอาหาร

1.8 ชุดย้อมสีแกรม

1.9 ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2. วิธีการปฏิบัติ

2.1 เจือจางตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใน Phosphate buffer solution (PBS) 225 มิลลิลิตร ทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำอาหารเจือจาง 1 มิลลิลิตร ไปเจือจางต่อใน Phosphate buffer solution (PBS) 9 มิลลิลิตร ทำเช่นเดียวกันนี้จนได้ความเจือจางที่เหมาะสม (10^{-2} , 10^{-3})

2.2 ดูดสารละลายตัวอย่าง 10^{-2} และ 10^{-3} ทำ 2 ซ้ำ แต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในจานอาหาร MSEA agar หรือ MSA หรือ MBP ชนิดใดชนิดหนึ่ง จากนั้น Spread plate ให้ทั่วจาน บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

2.3 สังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะโคโลนีของ *S. aureus* ใน MSEA agar และ MSA จะกลม สีเหลืองทอง รอบโคโลนีมีสีเหลือง ส่วนใน MBP จะมีโคโลนีสีดำล้อมรอบด้วยวงใส

2.4 เมื่อได้โคโลนีที่มีลักษณะตามที่ต้องการแล้ว นำมาย้อมสีแกรม ลักษณะรูปร่างของ *S. aureus* จะมีรูปกลมอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ติดสีแกรมบวก

2.5 นำเชื้อที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิม

2.6 เลี้ยงเชื้อใน Nutrient broth ให้มีอายุ 18 ชั่วโมง

2.7 ทดสอบการย่อย Gelatin ใน Nutrient gelatin โดยการ Stab เชื้อหรือใช้ห่วงเขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบแทงลงไปอาหารตรงๆ แล้วนำขึ้นมาตามรอยเดิม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากพบว่า Gelatin เหลวที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ถือว่าให้ผลบวก ซึ่งเป็นความสามารถของ *S. aureus*

2.8 ทดสอบการหมักย่อย Mannitol ถ้าให้กรดถือว่าให้ผลบวก ซึ่งเป็นความสามารถของ *S. aureus*

2.9 ทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงใน Blood agar แตก หากเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงแบบ β -haemolysis ถือว่าให้ผลบวก ซึ่งเป็นความสามารถของ *S. aureus*