ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์คุณภาพ

ก-1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 1995)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. Aluminum dish เส้นผ่านศูนย์กลาง $\geq$ 50 มิลลิเมตร สูง $\leq$ 40 มิลลิเมตร พร้อมฝาปิด
2. Air – tight desiccator
3. Hot air oven
4. Food chopper / Bowl cutter

การเตรียมตัวอย่าง

บดตัวอย่างอาหารที่ต้องการวิเคราะห์ความชื้นให้ละเอียดด้วย Food chopper

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 กรัมใส่ใน Aluminum dish ที่ผ่านการอบแห้ง และทราบน้ำหนักที่แน่นอน
2. บันทึกน้ำหนักตัวอย่างพร้อม Aluminum dish จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 105 ถึง 107 องศาเซลเซียสใน Hot air oven นานประมาณ 5 ชั่วโมง
3. นำออกมาจากตู้อบแล้วปล่อยให้เย็นใน Desiccator แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก นำไปอบซ้ำหลายๆ ครั้งจนได้น้ำหนักคงที่ (ค่าที่ได้แตกต่างกันไม่เกิน 0.05 กรัม)
4. คำนวณหาปริมาณความชื้น จากสมการ

$$\text{ปริมาณความชื้น (\% wet basis)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างที่หายไปหลังอบแห้ง} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

ก-2. การวิเคราห์ปริมาณโปรตีน (AOAC, 1995)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องวิเคราะห์โปรตีนแบบกึ่งอัตโนมัติ
2. Kjeldahl flask
3. อุปกรณ์ย่อย (Digester)
4. หลอดย่อย (Digester tube)
5. Exhaust maniford และ Apirator
6. Kjeltee 1002 distilling unit
7. Tube stand
8. Erlenmeyer flask 250 มิลลิลิตร
9. Boiling chips หรือ Glass bead
10. อุปกรณ์การไตเตรต

สารเคมี

1. $CuSO_4 5H_2O$
2. Anhydrous K_2SO_4
3. Conc. H_2SO_4
4. 4% Boric acid (H_3BO_3)
5. 50% NaOH solution
6. 0.1 N HCl
7. Methyl red – bromocresol green indicator ประกอบด้วย 0.016% metyl red และ 0.083% bromocresol green ใน ethyl alcohol

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างอาหารประมาณ 1 – 1.5 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ลงใน Kjeldahl flask ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยทำ Blank ควบคู่ไปด้วย

2. เติม $CuSO_4 5H_2O$ 0.5 กรัม K_2SO_4 5 กรัม และ Conc. H_2SO_4 25 มิลลิลิตร ลงใน Kjeldahl flask ตามลำดับ

3. วาง Kjeldahl tube บน Stand ปิด Heat shield แล้วสวม Exhaust manifold ลงบนส่วนบนของหลอด และเปิด Power ของ Exhaust

4. วางหลอดย่อยลงบนเครื่องย่อย ย่อยตัวอย่างโดยให้ความร้อนที่ระดับต่ำก่อน (ประมาณ 180 องศาเซลเซียส) รอจนควันจางลง จึงเพิ่มอุณหภูมิเป็น 250 องศาเซลเซียส ให้ความร้อนนานประมาณ 15 นาที หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 350 องศาเซลเซียส ย่อยจนได้สารละลายสีฟ้าใสของแอมโมเนียมซัลเฟต หลังจากการย่อยเสร็จสมบูรณ์ ยกชุดย่อยทั้งชุดขึ้นวางพัก

5. ตั้งสารละลายทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

6. เปิดก๊อกน้ำหล่อเย็นเครื่องกลั่น

7. เปิด Power ของเครื่องกลั่น (Kjeltee)

8. อุ่นเครื่องกลั่นโดยใช้หลอดที่มีน้ำกลั่นประมาณครึ่งหลอด และ Flask เปล่ามารองรับ เปิด Steam และกลั่นเป็นเวลา 5 นาที

9. ปิด Steam นำหลอด และ Flask ออกจากเครื่องกลั่น

10. นำ Flask ที่บรรจุสารละลาย 4% Boric acid ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และ Methyl red – bromocresol green indicator 2-3 หยด ไปตั้งไว้ในเครื่องกลั่น โดยให้ปลายแท่งแก้วจุ่มอยู่ใต้สารละลาย

11. เติม Glass bead 2 – 3 ลงในหลอดตัวอย่าง แล้วนำเข้าเครื่องกลั่น

12. เติม 50% NaOH 50 มิลลิลิตรลงในหลอดตัวอย่าง สารละลายที่ได้จะมีสีดำ

13. ตั้งระยะเวลาการกลั่น 5 นาที กลั่นจนได้ Condensate ประมาณ 150 มิลลิลิตร (สารละลาย Boric acid จะเปลี่ยนจากสีแดงม่วงเป็นสีเขียว)

14. นำสารละลายที่ได้ไปไตเตรตกับสารละลาย HCl ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนประมาณ 0.1 N ใช้ Methyl red – bromocresol green เป็น Indicator ที่จุดยุติ สารละลายจะเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีแดง – ม่วง บันทึกปริมาตรของสารละลาย HCl ที่ใช้

15. คำนวณปริมาณโปรตีน จากสมการ

$$\% \text{ Crude protein} = \frac{V\ (\text{sample} - \text{blank}) \times N \times F \times 14.007 \times 100}{\text{mg of sample}}$$

เมื่อ V = ปริมาตรของ Titrant ที่ใช้

N = Normallity ของ Titrant

F = Kjeldahl factor : General = 6.25

: Wheat = 5.70

: Dairy product = 6.38

14.007 = น้ำหนักอะตอมของ Nitrogen

ก-3. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC, 1995)

<u>อุปกรณ์และเครื่องมือ</u>

1. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไขมันแบบอัตโนมัติ (Soxtherm 2000 : Gerhardt)
2. Soxhlet extraction tube
3. Hot plate
4. Hot air oven
5. Desiccator

<u>สารเคมี</u>

Petroleum ether (40 – 60°C)

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งประมาณ 2 กรัม (ตัวอย่างที่ได้จากการหาปริมาณความชื้น) ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง ใส่ลงใน Thimble

2. ใส่ Thimble ที่บรรจุตัวอย่างลงใน Soxhlet extraction tube ที่ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนักของ Tube ที่แน่นอน

3. ใส่ Petroleum ether ประมาณ 150 มิลลิลิตร หรือให้ท่วมตัวอย่างลงใน Extraction tube

4. นำไปสกัดไขมันภายใต้สภาวะในการสกัด ดังนี้

Extraction temperature	150 °C
Boiling time	30 min
Solvent reduction A:	5 x 15 ml

Extraction time	80 min
Solvent reduction B:	8 min
Solvent reduction C:	5 min
Solvent reduction interval	3 min
Solvent reduction phase	3 sec

5. นำส่วนของ Ether ที่ละลายไขมันที่สกัดได้ ไปไล่ Ether ออกโดยให้ความร้อนบน Hot plate ภายในตู้ควัน

6. เมื่อไล่ Ether ออกหมดแล้ว ให้นำไขมันที่แยกได้ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที แล้วปล่อยให้เย็นใน Desiccator จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก

7. คำนวณหาปริมาณไขมันในตัวอย่าง จากสมการ

$$\text{\% Crude fat (\% wet basis)} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันที่สกัดได้ x 100}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้ง}}$$

ก-4. การวิเคราะห์ปริมาณเส้นใย (Crude fiber) (AOAC, 1995)

<u>อุปกรณ์และเครื่องมือ</u>

1. ชุดวิเคราะห์หาเส้นใย ประกอบด้วย Beaker 600 มิลลิลิตร Condenser และ เตาให้ความร้อน
2. ชุดกรองประกอบด้วยกรวยที่บุด้วยลวดแผ่นตาข่าย Filtering flask และ Suction pump
3. Desiccator
4. Hot air oven
5. Muffle furnace
6. Blender
7. Porcelain dish
8. Crucible
9. Boiling chips

สารเคมี

1. 1.25% (w/v) H_2SO_4 solution
2. 1.25% (w/v) NaOH solution
3. 95% ethyl alcohol

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียด และผ่านการสกัดไขมันออกแล้ว ประมาณ 2 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ใน Beaker ขนาด 600 มิลลิลิตร ถ้าตัวอย่างมีไขมันน้อยกว่า 1% การสกัดไขมันออกอาจไม่จำเป็นต้องทำ

2. เติม Boiling 1.25% H_2SO_4 solution 200 มิลลิลตร ลงในตัวอย่าง ใส่ Boiling chip ลงไป 2 – 3 ชิ้น เพื่อป้องกันการเดือดแบบ Bumping

3. นำไปต่อกับเครื่องย่อยที่เตรียมไว้ และต้มเป็นเวลา 30 นาที โดยให้เขย่า Beaker เป็นระยะๆ เพื่อไม่ให้ตัวอย่างเกาะที่ผนัง

4. นำ Beaker ออกจากเครื่องย่อยแล้วนำตัวอย่างไปกรองผ่านเครื่องกรอง

5. ล้างกากด้วยน้ำกลั่น โดยการ Rinse ด้วยน้ำกลั่นที่เดือด 50 – 75 มิลลิลิตร กรองผ่านเครื่องกรอง ทำซ้ำ 3 ครั้ง หรือจนหมดกรด

6. นำกากที่ล้างแล้วใส่ใน Beaker 600 มิลลิลิตร แล้วเติม Boiling 1.25% NaOH solution 200 มิลลิลิตร แล้วต่อกับเครื่องย่อย ต้มเป็นเวลา 30 นาที

7. นำกากมากรอง ล้างด้วย 1.25% H_2SO_4 solution 25 มิลลิลิตร 3 ครั้ง ตามด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร 3 ครั้ง และ Alcohol 25 มิลลิลิตร

8. นำกากที่ได้ไปใส่ใน Crucible ทำให้แห้ง โดยอบที่อุณหภูมิ 130 $\pm$ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นใน Desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก

9. นำไปเผาใน Muffle furnace ที่อุณหภูมิ 300 $\pm$ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีทำให้เย็นใน Desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก

10. คำนวณหาปริมาณเส้นใย จากสมการ

$$\text{\% Crude fiber (\% wet basis)} = \frac{(\text{น้ำหนักแห้งของกาก} - \text{น้ำหนักเถ้า}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

ก-5. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC, 1995)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เตาเผา (Muffle furnace)
2. Crucible
3. Hot plate
4. Air – tight desiccator
5. Food chopper / Bowl cutter

การเตรียมตัวอย่าง

บดตัวอย่างอาหารที่ต้องการวิเคราะห์เถ้าให้ละเอียดด้วย Food chopper

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดแระมาณ 10 กรัม ใส่ใน Crucible ที่ผ่านการเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นใน Desiccstor แล้วชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน

2. นำตัวอย่างไปให้ความร้อนบน Hot plate จนไม่มีควันดำ ก่อนนำไปเผาในเตาเผา

3. นำตัวอย่างที่ได้ไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้เถ้าสีขาวทั้งหมด เอาออกจากเตาเผา ปล่อยให้เย็นใน Desiccator แล้วชั่งหาน้ำหนักเถ้า

4. คำนวณหาปริมาณเถ้าของอาหาร จากสมการ

$$\text{\% Ash (\% wet basis)} = \frac{\text{น้ำหนักของเถ้า} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

ก-6. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (จากการคำนวณ)

ปริมาณคาร์โบไฮเดรตสามารถหาได้จากการคำนวณ ดังสมการ

$$\text{\% Carbohydrate} = 100 - \text{\%Crude protein} - \text{\%Crude fat} - \text{\%Moisture content} - \text{\%Ash} - \text{\%Crude fiber}$$

ก-7. การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. จานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
2. หลอดทดลอง
3. ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
4. เครื่องตีปั่นอาหาร (Stomacher) พร้อมถุงสำหรับตีปั่น
5. เครื่อง Vortex mixture
6. ตะเกียงแอลกอฮอล์
7. แอลกอฮอล์สำหรับฆ่าเชื้อโรคบริเวณทำการทดลอง
8. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
9. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
10. เครื่องนับจำนวนโคโลนี

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Plate count agar
2. Peptone
3. Sterile dilution water

การเตรียม Dilution water

เตรียม Dilution water โดยเตรียมสารละลายเปปโตน 0.1% ในน้ำกลั่น ฆ่าเชื้อโดยนำเข้าหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที พีเอชสุดท้ายที่ได้ควรมีค่าเท่ากับ 6.8

การเจือจางตัวอย่าง

1. เตรียม Dilution water 90 มิลลิลิตร กับตัวอย่างที่สุ่มมาด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ 10 กรัม ตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่นอาหารนาน 1 นาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่เจือจางในอัตราส่วน 1:10

2. ใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดตัวอย่างอาหารที่ระดับความเจือจาง 1:10 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน Dilution water 9 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลอง นำหลอดทดลอง

ไปเขย่าด้วยเครื่อง Vortex mixer ให้เข้ากัน จะได้สารละลายตัวอย่างอาหารที่ระดับความเข้มข้น 1:100

3. เตรียมตัวอย่างอาหารที่ระดับความเข้มข้น 1:1000 หรือระดับความเข้มข้นอื่นๆ ได้ด้วยวิธีที่กล่าวมาข้างต้น

วิธีการตรวจวิเคราะห์

1. เตรียมจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยเขียนหมายเลขตัวอย่าง และรายละเอียดต่างๆ ลงบนฝาจานเพาะเชื้อ

2. ทำความสะอาดบริเวณโต๊ะปฏิบัติการด้วยแอลกอฮอล์

3. เตรียมตัวอย่างอาหารที่ระดับความเจืองจางระดับต่างๆ

4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ (Plate count agar) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาหลอมเหลวในน้ำร้อน

5. เปิดฝาภาชนะตัวอย่างด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ โดยลนไฟที่ปากภาชนะก่อนปิเปตตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจากเพาะเชื้อ โดยเปิดฝาเพียงเล็กน้อย

6. เท Plate count agar ลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15 – 20 มิลลิลิตร ปิดฝา แล้วหมุนจานเพาะเชื้อเบาๆ เพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อและตัวอย่างผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

7. ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว ประมาณ 15 นาที แล้วพลิกคว่ำจานเพาะเชื้อลงนำเข้าไปบ่มใน Incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 $\pm$ 2 ชั่วโมง

8. นับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ หาค่าเฉลี่ย และรายงานผลในหน่วยจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต่อกรัมอาหาร

ก-8. การวิเคราะห์ปริมาณยีสต์ และรา (Yeast and mold count)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. จานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
2. หลอดทดลอง
3. Spreader
4. ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
5. เครื่องตีปั่นอาหาร (Stomacher) พร้อมถุงสำหรับตีปั่น
6. เครื่อง Vortex mixture

7. ตะเกียงแอลกอฮอล์
8. แอลกอฮอล์สำหรับฆ่าเชื้อโรคบริเวณทำการทดลอง
9. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
10. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
11. เครื่องนับจำนวนโคโลนี

<u>อาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

1. 0.1 N Tartaric Acid
2. Potato Dextrose Agar (PDA)

<u>การเตรียม Dilution water</u>

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีเดียวกันกับการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count)

<u>การเจือจางตัวอย่าง</u>

ทำการเจือจางตัวอย่างด้วยวิธีเดียวกันกับการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count)

<u>วิธีการตรวจวิเคราะห์</u>

1. เตรียมจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยเขียนหมายเลขตัวอย่างและรายละเอียดต่างๆ ลงบนฝาจานเพาะเชื้อ
2. ทำความสะอาดบริเวณโต๊ะปฏิบัติการด้วยแอลกอฮอล์
3. เตรียมตัวอย่างอาหารที่ระดับความเจืองจางระดับต่างๆ
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ คือ Potato Dextrose Agar (PDA) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มาหลอมเหลวในน้ำร้อน ปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย 0.1 N Tartaric Acid ให้มีค่าพีเอชสุดท้ายประมาณ 3.5 แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับค่าพีเอชแล้วลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15 – 20 มิลลิลิตร ปล่อยให้วุ้นแข็งตัวประมาณ 15 นาที

5. เปิดฝาภาชนะตัวอย่างด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ โดยลนไฟที่ปากภาชนะก่อน ปิเปตตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจากเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่แข็งตัวแล้ว โดยเปิดฝาเพียงเล็กน้อย

6. นำ Spreader จุ่มแอลกอฮอล์ แล้วเผาไฟเพื่อฆ่าเชื้อ รอให้เปลวไฟดับ ทิ้งให้เย็น จากนั้นใช้ spreader คนบนผิวหน้าของวุ้นเพื่อให้ตัวอย่างกระจายทั่วจานเพาะเชื้อ

7. ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำเข้าไปบ่มใน Incubator ที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 - 120 ชั่วโมง โดยไม่ต้องพลิกคว่ำจานลง

8. นับจำนวนเชื้อยีสต์ และราที่เจริญเติบโตในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ หาค่าเฉลี่ย และรายงานผลในหน่วยจำนวนยีสต์ และราทั้งหมดต่อกรัมอาหาร