ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
รูปภาพประกอบในการทำผลิตภัณฑ์

ภาพที่ ก.1 ลักษณะของข้าวซ้อมมือ ข้าวเจ้าชัยนาท ข้าวหอมมะลิแม่จัน และข้าวหอมมะลิสุรินทร์

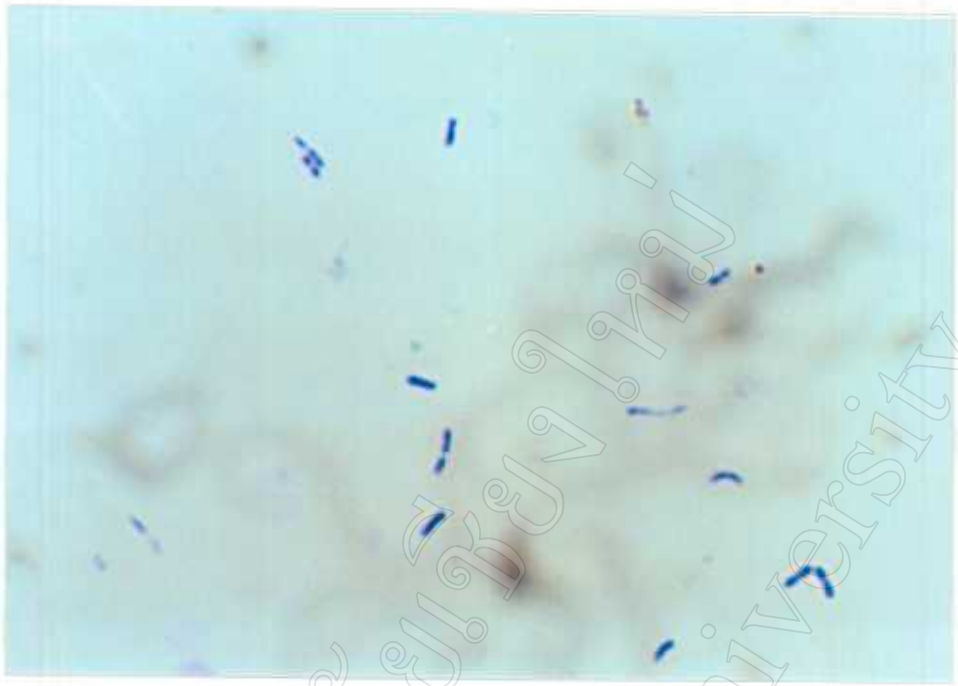
ภาพที่ ก.2 ลักษณะของอังคัก (Ang-kak)

ภาพที่ ก.3 ลักษณะของน้ำมันพืชที่ผ่านการแช่แข็งที่ -13°ซ นาน 12 ชั่วโมง และเนยขาวที่อุณหภูมิห้อง

ภาพที่ ก.4 แสดงเครื่องปรุงของไส้กรอก

ภาพที่ ก.5 แสดงเครื่องสับผสม (Bowl Chopper)

ภาพที่ ก.6 แสดงเครื่องยัดไส้ (Stuffer)



ภาพที่ ก.7 แสดงจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิปานกลาง

ภาพที่ ก.8 ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกที่ทำจากน้ำมันพืช ไขมันสัตว์ และไส้กรอกจากท้องตลาด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

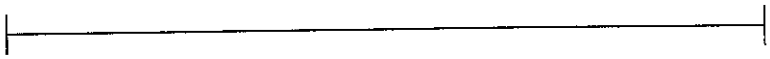
ภาคผนวก ข

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

การทดสอบสร้างเค้าโครงผลิตภัณฑ์

จงเขียนคำที่ท่านอยากอธิบายลักษณะแต่ละลักษณะของผลิตภัณฑ์ไส้กรอก กำหนดเครื่องหมาย X ที่ระดับความเข้มข้นของลักษณะนั้น ๆ ที่เป็นอยู่ และกำหนดเครื่องหมาย I ที่ระดับความเข้มข้นที่ควรจะเป็นหรือดีเลิศที่สุดบนสเกล ซึ่งเป็นค่าในอุดมคติ

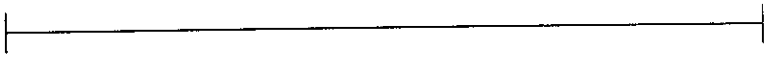
.....



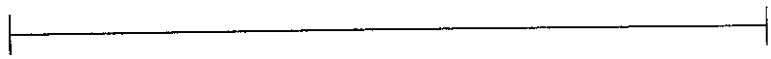
.....

.....

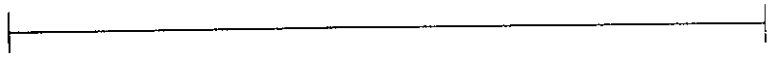
.....



.....



.....



.....

.....

แบบทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส

HEDONIC SCALE SCORING TEST PREFERENCE

ชื่อผู้ทดสอบชิม.....วันที่.....

ชื่อผลิตภัณฑ์ ไส้กรอก

คำชี้แจง โปรดทดสอบตัวอย่างต่อไปนี้ และให้ระดับความชอบและไม่ชอบต่อผลิตภัณฑ์แต่ละตัวอย่าง ใช้สเกลที่เหมาะสมเพื่อแสดงให้เห็นว่าท่านได้อธิบายความรู้สึกชอบและไม่ชอบในระดับใด?

ระดับของความชอบ	ผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง			
	.....	.....	.....	.....
ชอบมากที่สุด (Like extremely)	.....	.....	.....	.....
ชอบมาก (Like very much)	.....	.....	.....	.....
ชอบปานกลาง (Like moderately)	.....	.....	.....	.....
ชอบเล็กน้อย (Like slightly)	.....	.....	.....	.....
เฉย ๆ (Neither like nor dislike)	.....	.....	.....	.....
ไม่ชอบเล็กน้อย (Dislike slightly)	.....	.....	.....	.....
ไม่ชอบปานกลาง (Dislike moderately)	.....	.....	.....	.....
ไม่ชอบมาก (Dislike very much)	.....	.....	.....	.....
ไม่ชอบมากที่สุด (Dislike extremely	.....	.....	.....	.....

เหตุผลความชอบหรือไม่ชอบผลิตภัณฑ์

: .....

: .....

: .....

: .....

แบบทดสอบคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอิมัลชั่น

ชื่อผู้ทดสอบ..... วันที่.....

กรุณาเขียนเครื่องหมาย **X** บนเส้นตรง ซึ่งแทนระดับความน้อย-มากในแต่ละลักษณะของไส้กรอกอิมัลชั่นที่ท่านทดสอบ และเครื่องหมาย I แทนระดับที่ท่านคิดว่าลักษณะนั้น ๆ ของผลิตภัณฑ์ควรจะเป็นในอุดมคติ

คุณลักษณะของไส้กรอกอิมัลชั่น

1.สี

สีชมพูอ่อน _____ สีแดงเข้ม

2.กลิ่นเครื่องเทศ

น้อย _____ มาก

3.กลิ่นเนื้อ

น้อย _____ มาก

4.รสเค็ม

น้อย _____ มาก

5.ความเป็นเนื้อเดียวกัน

น้อย _____ มาก

6.ความแน่นเนื้อ

น้อย _____ มาก

7.ความฉ่ำน้ำ

น้อย _____ มาก

8.การยอมรับโดยรวม

น้อย _____ มาก

คำอธิบายประกอบการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส

การทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกแบ่งออกได้เป็น 8 คุณลักษณะที่สำคัญได้แก่ สี กลิ่นเครื่องเทศ กลิ่นเนื้อ รสเค็ม ความเป็นเนื้อเดียวกัน ความแน่นเนื้อ ความฉ่ำน้ำ และการยอมรับโดยรวม

คำอธิบายลักษณะของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกมีดังนี้

สี

พิจารณาจากสีของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกโดยรวม ซึ่งจะมีสีแดงชมพู (Rosy color) สีจะเกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีของสารไนไตร์ทร่วมกับการเติมแต่งสีด้วยอังคัก

กลิ่นเครื่องเทศ

พิจารณาจากกลิ่นเครื่องเทศที่เกิดจากการเติมแต่งเครื่องเทศทั้ง 6 ชนิดตามสูตรได้แก่ พริกไทย ลูกจันทน์ ดอกจันทน์ ปาปริกา เมล็ดผักชี และเมล็ดยี่หร่า ซึ่งผสมกันในอัตราส่วนที่กำหนดไว้แล้ว ดังนั้นกลิ่นเครื่องเทศที่เพิ่มขึ้นเกิดจากเครื่องเทศทั้ง 6 ชนิดที่มีปริมาณมากขึ้น

กลิ่นเนื้อ

พิจารณาจากกลิ่นเนื้อของไส้กรอก ซึ่งเป็นกลิ่นของเนื้อหมูที่ผ่านการปรุงด้วยเครื่องปรุงชนิดต่าง ๆ จนถึงกระบวนการให้ความร้อน เครื่องปรุงหรือส่วนผสมอื่น ๆ ที่เติมลงไปอาจช่วยในการลดหรือเพิ่มกลิ่นเนื้อได้

รสเค็ม

พิจารณาจากรสเค็มของผลิตภัณฑ์ ซึ่งเกิดจากเกลือที่เติมลงไปในผลิตภัณฑ์ เพื่อสกัดโปรตีนจากเนื้อและเพิ่มรสชาติไปในตัว

ความเป็นเนื้อเดียวกัน

พิจารณาจากเนื้อไส้กรอกที่มีความเนียน เรียบ เข้ากันได้ดี ไม่แตกออกจากกัน

ความแน่นเนื้อ

พิจารณาจากแรงที่ใช้ในการกัดเนื้อไส้กรอก การเกาะตัวของอนุภาคภายในเนื้อไส้กรอก

ความฉ่ำน้ำ

พิจารณาจากความฉ่ำของเนื้อไส้กรอก ถ้ามีความฉ่ำสูงแสดงว่าไส้กรอกสามารถอุ้มน้ำได้ในปริมาณมาก

การยอมรับโดยรวม

เป็นการประเมินความชอบและการยอมรับของผลิตภัณฑ์โดยพิจารณาจากคุณลักษณะทั้ง 7 ประการที่กล่าวมา

ภาคผนวก ค

วิธีวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์

การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

การวิเคราะห์ Total Expression Fluid (Hughes *et al.*, 1997)

ชั่ง batter 25 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge (Gallenkamp, England) ที่ 4,000 rpm นาน 1 นาที ให้ความร้อนแก่ตัวอย่างที่ 70°ซ นาน 30 นาที ด้วย water bath (Chiang Mai, Thailand) ปั่นเหวี่ยงต่ออีก 3 นาที ที่ 4,000 rpm นำตัวอย่างที่เป็นก้อน (pellet) ไปชั่งน้ำหนัก คำนวณ Total Expression Fluid (%) ได้ดังนี้

TEF = (น้ำหนัก Centrifuge tube + Sample) – (น้ำหนัก Centrifuge tube + Pellet)

$$\text{TEF (\%)} = \frac{\text{TEF X 100}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

การวิเคราะห์ Cooking yield (Ladwig *et al.*, 1989)

$$\text{Cooking yield (\%)} = \frac{\text{Cooking weight X 100}}{\text{Raw weight}}$$

การวัดค่าแรงเฉือน (Instron Universal Testing Machine Model 5565, USA)

วัดค่าแรงเฉือนโดยใช้ probe ชนิด Warner Bratzler Meat Compression วัดค่าแรงเฉือน (Shear force) จากค่า Peak load (นิวตัน) โดยทำการ Calibrate เครื่องก่อน แล้วติดตั้ง probe เพื่อใช้วัด ทดสอบระยะในการตัดระหว่าง probe และตัวอย่าง เพื่อให้ตัดตัวอย่างได้ขาดออกจากกันอย่างสมบูรณ์ ซึ่งตั้งค่าระยะทางเท่ากับ 5 ซ.ม. โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของไส้กรอกเท่ากับ 2.3 ซ.ม. ขนาดความยาวประมาณ 4 ซ.ม. ตั้งอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของ probe เท่ากับ 100 มิลลิเมตรต่อวินาที ตั้งค่า return เมื่อเสร็จสิ้นการทดสอบต่อหนึ่งตัวอย่าง เมื่อตั้งค่าต่าง ๆ เรียบร้อยกด start probe จะเริ่มเคลื่อนที่ลงเพื่อตัดไส้กรอก บันทึกค่า Peak load ที่ได้ซึ่งมีหน่วยเป็นนิวตัน

การวัดค่าสี (ColorQuest II ,Hunter Laboratory Inc., USA)

<u>การ calibrate เครื่องวัดสี</u>

ก่อนการใช้งานต้องทำการ calibrate เครื่องวัดสีก่อน โดยตั้งค่าระบบตรวจเช็คการวัดสีให้เป็นแบบ R-sin คือแบบสะท้อนแสง แล้วคลิกที่ปุ่ม calibrate หลังจากนั้นวางแผ่นสีมาตรฐานลงในช่องตรวจวัดสีตามที่ระบบคอมพิวเตอร์สั่งการ

<u>การวัดสีของผลิตภัณฑ์</u>

เลือกระบบการวัดสีเป็นแบบ HunterLab นำตัวอย่างไส้กรอกประมาณ 50 กรัมบดให้ละเอียดใส่ในเซลล์วัดสี นำตัวอย่างวางในช่องตรวจวัดสี คลิกปุ่ม sample เพื่ออ่านค่าสี Lab ค่าสีในระบบ HunterLab นั้น ค่า L (Lightness) คือความสว่าง มีค่าตั้งแต่ 0 หมายถึงสว่างน้อย ถึง 100 หมายถึงสว่างมาก ค่า a (Redness) คือค่าสีแดง-เขียว ค่าที่เป็นบวกหมายถึงสีแดง ค่าที่เป็นลบหมายถึงสีเขียว ค่า b (Yellowness) ค่าที่เป็นบวกหมายถึงสีเหลือง ค่าที่เป็นลบหมายถึงสีน้ำเงิน สำหรับระบบ CIELAB ต้องแปลงค่าเป็น L C h โดยค่า L หมายถึงความสว่าง (ไม่ต้องแปลงค่า) ค่า C (chroma) หมายถึงความอิ่มตัวของสีมีค่าเท่ากับ $(a^2 + b^2)^{1/2}$ ค่า h (hue value) หมายถึงมุมในการหมุนของแกนระหว่างค่าสีแดงถึงสีน้ำเงิน โดย h เท่ากับ 0 หมายถึงสีแดง, h เท่ากับ 90 หมายถึงสีเหลือง, h เท่ากับ 180 หมายถึงสีเขียว และ h เท่ากับ 270 หมายถึงสีน้ำเงิน ค่า h value จะใช้ในการเปรียบเทียบสีของผลิตภัณฑ์ (Hutchings, 1999; Fabre *et al.*, 1993)

การวัดค่า pH

ก่อนวัดค่า pH จะต้องตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องมือด้วยสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานที่มีความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.00 และ 7.00 เตรียมตัวอย่างสำหรับวัดค่า pH โดยใช้ตัวอย่าง 1 ผสมกับน้ำกลั่นบริสุทธิ์ในอัตราส่วน 1:9 นำไปวัดด้วยเครื่อง pH meter

การวัดค่า a_w

ก่อนวัดค่าต้องทำการ Calibrate เครื่องก่อน ด้วยตัวอย่างมาตรฐานที่มีค่า aw เท่ากับ 0.75, 0.53, 0.98 และ 0.90 แล้วจึงใส่ตัวอย่างที่บดละเอียดลงไปในตลับวัดค่า aw รอให้เกิดสภาวะสมดุลประมาณ 30 นาที อ่านค่าและจดบันทึก

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

การวิเคราะห์หาปริมาณ Thiobarbituric acid number (Pearson, 1976)

สารเคมีและวิธีการเตรียม

1. Thiobarbituric acid reagent

ละลายกรด thiobarbituric จำนวน 0.2883 กรัม ในสารละลายกรดอะซิติคความเข้มข้น 90% โดยการอุ่นเบา ๆ แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยกรดอะซิติคความเข้มข้น 90% ใน volumetric flask

วิธีทำ

ชั่งตัวอย่างไส้กรอกมา 10 กรัม ปั่นกับน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรใน mechanical blender แล้วเทใส่ใน distillation flask ขนาดพอเหมาะ ล้าง blender ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 47.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดเกลือความเข้มข้น 4 โมล่าร์ จำนวน 2.5 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ pH เท่ากับ 1.5 แล้วเติม anti-foaming ต่อเครื่องกลั่นเข้าด้วยกัน และนำไปต้มโดยใช้ electric mantle กลั่นจนเก็บของเหลวที่กลั่นได้มา 50 มล. (ภายในเวลา 10 นาที หลังเดือด) ปิเปตของเหลวที่กลั่นได้มา 5 มล. ใส่ในหลอดแก้วที่มีฝาปิด เติมสารละลาย thiobarbituric acid reagent ลงไป 5 มล. ปิดฝา เขย่า แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลานาน 35 นาทีเท่านั้น (exactly) ทำ blank พร้อมไปด้วย โดยใช้น้ำกลั่น 5 มล. และสารละลายกรด thiobarbituric 5 มล. ทำให้เย็นภายใน 10 นาที นำไปวัดค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ blank คำนวณค่า TBA ดังนี้

TBA number = 7.8 X O.D. (มิลลิกรัม malonaldehyde ต่อกิโลกรัม)

การวิเคราะห์หาความชื้น (AOAC, 1995)

วิธีทำ

ชั่งตัวอย่างให้ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 5 กรัม ใส่ลงในจานโลหะที่ผ่านการอบและทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว เติมทรายที่อบแห้งและทราบน้ำหนักที่แน่นอนใส่ลงไปด้วย นำจานโลหะไปอบในตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้แน่นอนที่ 100-105^{o}ซ นานประมาณ 3 ชั่วโมง นำออกมาจากตู้อบและปล่อยให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งหาน้ำหนัก นำไปอบซ้ำหลาย ๆ ครั้งจนได้น้ำหนัก

ที่คงที่ ซึ่งค่าจะต้องไม่แตกต่างกันเกิน 0.05 กรัม ชั่งหาน้ำหนักของของแข็งที่เหลืออยู่ คำนวณหาน้ำหนักของน้ำที่หายไป และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักที่หายไป X 100}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้}}$$

เนื่องจากเนื้อสัตว์ประกอบด้วยส่วนที่เป็นเนื้อแดงและไขมัน ซึ่งปริมาณไขมันที่มีอยู่ในเนื้อสัตว์แต่ละชนิดแตกต่างกัน ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนและน้ำแปรเปลี่ยนไปด้วย อย่างไรก็ตาม เมื่อคิดปริมาณโปรตีนและน้ำบนพื้นฐานที่ไม่รวมไขมัน (on fat-free basis) จะทำให้ได้ปริมาณโปรตีนและน้ำที่ใกล้เคียงกันในเนื้อแต่ละชนิด ตามตารางข้างล่าง

Type of meat	water content	water in fat-free	fat	protein	protein in fat-free	ash
Beef	59	76.7	23	17	22.1	1
Mutton	55	77.4	29	15	21.1	1
Pork	46	76.7	40	13	21.7	1

ที่มา : Pearson (1973)

จะเห็นได้ว่า water in fat-free มีประมาณ 3/4 ในเนื้อสัตว์ และปริมาณ protein in fat-free มีประมาณ 22% ซึ่งในเนื้อสัตว์แต่ละชนิดจะมีปริมาณน้ำและโปรตีนใกล้เคียงกันเมื่อคำนวณบนพื้นฐานที่ไม่รวมไขมัน ดังนั้นการคำนวณปริมาณน้ำและโปรตีนของไส้กรอกที่ทำจากน้ำมันพืชบนพื้นฐานที่ไม่รวมไขมัน จะได้ว่า Protein in fat-free เท่ากับ 15.90% และ Water in fat-free เท่ากับ 78.45% ซึ่งแสดงวิธีการคำนวณได้ดังนี้

$$\text{Protein in fat-free} = \frac{\text{Protein}}{(100 - \text{Fat})} \times 100 = \frac{11.96}{(100-24.79)} \times 100$$

$$\text{Water in fat-free} = \frac{\text{Water}}{(100 - \text{Fat})} \times 100 = \frac{59.00}{(100-24.79)} \times 100$$

การวิเคราะห์หาเถ้า (AOAC, 1995)

วิธีทำ

เผาจานกระเบื้องซิลิก้าก้นแบน (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 7 เซนติเมตร) ในเตาเผา (muffle furnace) ที่อุณหภูมิ 500°ซ นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator ชั่งน้ำหนักของจานเปล่า

ชั่งตัวอย่าง 2-5 กรัม ใส่ลงในจานสำหรับหาเถ้า เผาไหม้อาหารจนกระทั่งหมดควันดำด้วยตะเกียงบุนเซน แล้วนำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิประมาณ 500-550°ซ คำนวณหาปริมาณเถ้าดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์เถ้า} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้า}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

การวิเคราะห์หาโปรตีน (Pearson, 1976)

สารเคมีที่ใช้

1. คะตะลิสต์ผสม (Catalyst mixture) ประกอบด้วยโซเดียมซัลเฟตปราศจากน้ำ 96% คอปเปอร์ซัลเฟต 3.5% และเซเลเนียมไดออกไซด์ 0.5%
2. กรดกำมะถันเข้มข้น (ปราศจากไนโตรเจน)
3. สารละลายกรดบอริคความเข้มข้น 2%
4. สารละลายเมธิลเรดอินดิเคเตอร์ ประกอบด้วยเมธิลเรด 0.016% และโบรโมครีซอลกรีน 0.083% ในเอธิลแอลกอฮอล์
5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50%
6. สารละลายกรดกำมะถันความเข้มข้น 0.05%

วิธีทำ

ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 กรัม (ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ใน Kjeldahl digestion flask ขนาด 30-35 มล. ใช้คะตะลิสต์ผสม 0.8 กรัมและกรดกำมะถันเข้มข้นจำนวน 2 มล. นำส่วนผสมทั้งหมดไปย่อยบนเตาย่อยจนใส แล้วให้ความร้อนต่ออีกหนึ่งชั่วโมง จึงหยุดการย่อย

นำของเหลวที่ย่อยได้นั้นเทลงในส่วนที่ใช้สำหรับกลั่น (steamed out apparatus) ใช้น้ำกลั่นจำนวนเล็กน้อยล้างฟลาสค์ที่ใช้ในการย่อย แล้วเทของเหลวที่ได้จากการล้างลงไปรวมกับของเหลวที่ใช้กลั่น เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 40% ลงไป 15 มล. ปิดด้วยจุกแก้ว กลั่นไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียโดยใช้ Steam distillation ใส่ลงในฟลาสค์ขนาด 250 มล. ที่มีสารละลายกรดบอริคความเข้มข้น 2% จำนวน 10 มล. และอินดิเคเตอร์ (Screened methyl red) 2-3 หยด กลั่นประมาณ 10-15 นาที แล้วล้างปลาย Condenser ด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย นำของเหลวที่กลั่นได้ไปไตเตรตกับสารละลายกรดเกลือความเข้มข้น 0.02 โมล่าร์ บันทึกปริมาณกรดที่ใช้เพื่อนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในอาหารตัวอย่าง

1 มิลลิลิตรสารละลายกรดกำมะถันความเข้มข้น 0.05 โมล่าร์ (0.1 นอร์มอล) ทำปฏิกิริยาสมมูลย์พอดีกับไนโตรเจน 0.0014 กรัม

ปริมาณไนโตรเจน = (14.01 X (A–b) X (N)) / W

A = ปริมาณ HCl ที่ไตเตรตในตัวอย่าง

b = ปริมาณ HCl ที่ไตเตรตใน blank

N = จำนวนนอร์มอลของ HCl ที่ใช้ไตเตรท

ปริมาณโปรตีนของตัวอย่างไส้กรอก = ปริมาณไนโตรเจน X 6.25

การวิเคราะห์หาไขมัน (AOAC, 1995)

<u>วิธีทำ</u>

นำของแข็งที่เหลือจากการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำ ใส่ใน thimble ให้หมด ปิดด้วยสำลีที่สกัดเอาไขมันออกแล้ว นำ thimble ใส่ลงไปใน extraction unit ของ soxhlet apparatus เติมปิโตรเลี่ยมอีเทอร์ลงไปให้มีปริมาณเพียงพอที่จะทำให้เกิดการสกัดอย่างสมบูรณ์ ติดตั้งฟลาสค์และ extraction unit เข้ากับ condenser แล้วเริ่มสกัด โดยใช้ water bath เป็นตัวให้ความร้อนจนครบ 6 ชั่วโมง หยุดการสกัด แยก soxhlet flask ออกจาก extractor เอา thimble ที่ใส่ของแข็งออก นำ soxhlet flask ไประเหยเอาอีเทอร์ออก แล้วอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100°ซ นานประมาณ 45 นาที ปล่อยให้เย็นใน desiccator ชั่ง soxhlet flask ที่มีไขมัน คำนวณปริมาณไขมันดังนี้

$$\text{เปอรเซ็นต์ไขมัน} = \frac{\text{ปริมาณไขมันที่สกัดได้}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

การหาปริมาณคาร์โบไฮเดรต (AOAC, 1995)

คาร์โบไฮเดรตในตัวอย่างอาหารจะรวมถึงกากใยอาหารด้วย (crude fiber) ซึ่งหาได้จากการนำค่า 100 เปอร์เซ็นต์ลบกับปริมาณเปอร์เซ็นต์ของไขมัน โปรตีน เถ้า และน้ำ จะทำให้ได้ค่าคาร์โบไฮเดรตรวมทั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่าง

การวิเคราะห์หาปริมาณเกลือ (Pearson, 1976)

ชั่งตัวอย่างอาหาร 10 กรัม ปั่นผสมกับน้ำกลั่นใน blender ปรับปริมาณในขวดปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 100 มล. กรองด้วยกระดาษกรอง ดูดสารละลายที่กรองได้จำนวน 10 มล. นำไปไตเตรทกับสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ โดยใช้สารละลายโปแตสเซียมโครเมตความเข้มข้น 5% ปริมาตร 0.5-1 มล. เป็นอินดิเคเตอร์ จุดยุติคือจุดที่มีสีส้มอ่อนปรากฏให้เห็น คำนวณหาเปอร์เซ็นต์เกลือในตัวอย่าง

1 มิลลิลิตรของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ ทำปฏิกิริยาสมมูลพอดีกับเกลือแกงจำนวน 0.005845

$$\text{เปอร์เซ็นต์เกลือ} = \text{ปริมาตรของซิลเวอร์ไนเตรต} \times 0.5845$$

การวิเคราะห์หา Residual nitrate and Residual nitrite (Tenimura, 1975)

<u>สารเคมีที่ใช้</u>

1. NH_4-buffer หรือ NH_4OAC 1% ปรับ pH ให้เป็น 9 ด้วย NH_4OH 10%
2. NEDA 0.1% (naphthylethylenediamine)
3. NH_4OAC 10% ปรับ pH ให้เป็น 9 ด้วย NH_4OH 10% (ammonium acetate buffer solution)
4. HCl 0.1 N
5. $ZnSO_4$ 12%

6. NH_4OH 10%

7. NaOH 2%

8. HCl 6 M

9. HCl 0.1 N

10. Sulfanilamide 0.2% เตรียมโดยใช้ HCl 50% เป็นตัวทำละลาย

<u>วิธีทำ</u>

-การเตรียม $NaNO_3$ Standard

เตรียม stock โดยชั่ง $NaNO_3$ (อบแห้ง 110°ซ นาน 4 ชั่วโมง) จำนวน 0.1518 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 250 มล.ด้วย NH_4OAC 1% จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วเตรียมสารละลายให้มีความเข้มข้น 0, 4 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จาก stock โดยปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ด้วย NH_4OAC 1%

-การเตรียม $NaNO_2$ Standard

เตรียม stock โดยชั่ง $NaNO_2$ จำนวน 0.0493 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 250 มล. ด้วย NH_4OAC 1% จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วเตรียมสารละลายให้มีความเข้มข้น 0, 1 และ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จาก stock โดยปรับปริมาตรให้เป็น 50 มล. ด้วย NH_4OAC 1%

-การหาปริมาณ NO_2-N และ NO_3-N

ชั่งตัวอย่างจำนวน 5 กรัม ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มล. เติม NH_4OAC 1% จำนวน 10 มล. เขย่าแล้วปรับให้ได้ pH 9 แล้วจึงนำไปอุ่นใน water bath ที่ 80°ซ นาน 10 นาที เติม $ZnSO_4$ 12% จำนวน 5 มล. และ NaOH 2% จำนวน 5 มล. (เติมขณะที่ยังอยู่ใน water bath) อุ่นต่ออีก 5 นาที แล้งจึงเอาออกจาก water bath ทิ้งไว้ให้เย็น เติม NH_4OAC 10% จำนวน 10 มล. ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล.ด้วย NH_4OAC 1% ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนนาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42

ก. การหา NO_2-N จะต้องดูดสารละลายใสที่กรองได้จำนวน 5 มล. ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มล. เติม sulfanilamide 0.2% จำนวน 2 มล. และ NEDA 0.1% จำนวน 1 มล. ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที นำมาวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 540 nm.

ข. การหา NO_3-N จะต้องดูดสารละลายใสที่กรองได้จำนวน 5 มล. แล้วเติม NH_4OAC 1% จำนวน 15 มล. ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มล. เติม sulfanilamide 0.2% จำนวน 2 มล. และ NEDA 0.1% จำนวน 1 มล. ตั้งทิ้งไว้ 20 นาทีก่อนผ่านคอลัมน์

-การใช้คอลัมน์

ล้างคอลัมน์แคดเมี่ยม (Cd) ด้วย HCl 6 M แล้วล้างน้ำอีก 2 ครั้ง ใส่ NH_3OAC 1% จำนวน 25 มล. ปรับอัตราการไหลให้เป็น 4 มล.ต่อ 1 นาที ใส่ NO_3-N (หรือ NO_2-N) ลงในคอลัมน์จำนวน 5 มล. แล้วเติม NH_4OAC 1% จำนวน 20 มล. นำไปอ่านค่า absorbance ที่ 540 nm. คำนวณหาปริมาณ $NaNO_3$ และ $NaNO_2$ ได้ดังนี้

$$NaNO_3 = \frac{(\text{concentrate of } NO_3\text{-N}) - (\text{concentrate of } NO_2\text{-N}) \times 6.07}{\text{weight of Sample}}$$

$$NaNO_2 = \frac{(\text{concentrate of } NO_2\text{-N}) \times 4.93}{\text{weight of Sample}}$$

การวิเคราะห์หาปริมาณคอเลสเตอรอล (AOAC 976.26, 1990)

<u>สารเคมีที่ใช้</u>

1. Cholesterol standard solutions เตรียม stock solution เท่ากับ 1.0 mg/ml DMF (dimethylformamide) และเตรียมสารละลายจาก standard stock solution ให้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.05 ถึง 0.5 mg/ml DMF

2. 5α-cholestane internal standard solutions (No.19505, Applied Science) เตรียม stock solution เท่ากับ 1.0 mg/ml ηe-heptane และเตรียมสารละลาย internal standard solution จาก stock solution ให้ได้ 0.2 mg/ml η-heptane

3. Dimethyldichlorosilane (No.18008, Applied Science)

4. Dimethylformamide (Burdick&Jackson Laboratories, Inc.; Anspec Co., Inc., PO Box 7730, Ann Arbor, MI 48107)

5. Glass wool-Silane-treated (No. 14502, Applied Science)

6. η-Heptane (Burdick & Jackson Laboratories, Inc., Eastman Kodak Co., No.2215)

7. Hexamethyldisilazane (HMDS) (No.18006, Applied Science, Pierce Chemical Co.)

8. Concentrated potassium hydroxide solution เตรียมโดยใช้ KOH 60 g ละลายในน้ำ 40 ml

9. Reagent alcohols – EtOH : MeOH : isopropanol อัตราส่วน 90 : 5 : 5 (EM Diagnostics, A Div. of EM Industries, Inc., 480 Democrat Rd, Gibbstown, NJ 08027; Wilkens-Anderson Co., 4525 W Division St, Chicago IL 60651; No.7019 or No.7006, Mallinckrodt Chemical Works)

10.Toluene-Nanograde (Mallinckrodt Chemical Works)

11.Trimethylchlorosilane (TMCS) (No.18010, Applied Science)

12.Trimethylsilyl (TMS) reagent – HMDS : TMCS : Pyridine อัตราส่วน 9 : 6 : 10

13. Adsorbent – Celite 545, acid washed (Johns-Manville Products Corp.) จะต้องล้างด้วยกรด เมื่อพบสิ่งปลอมปนจะต้องใส่ glass wool ลงใน chromatographic tube (≥ 100 mm. diam.) เติม siliceous earth ให้มีความสูงประมาณ 5 เท่าของเส้นผ่าศูนย์กลาง เติม HCl ประมาณ 1/3 ของปริมาณ siliceous earth และทำการกรองผ่าน หลังจากนั้นล้างด้วย MeOH โดยค่อย ๆ เทที่ผนังหลอด ใช้กระดาษวัดความชื้น ให้ความร้อนบน steam bath เพื่อไล่ MeOH ออกมา และทำให้แห้งที่ 105°ซ จนกระทั่งสารที่อยู่ในหลอดเป็นผงละเอียดและไม่มี MeOH เก็บรักษาในภาชนะปิดสนิท

<u>อุปกรณ์ที่ใช้</u>

1. Centrifuge tubes (Pyrex No. 13, 15) ล้างทำความสะอาดด้วย Anhyd. MeOH และทำให้แห้งที่ 110°ซ นาน 30 นาที ย้ายใส่ desiccator เติมสารละลาย 10% dimethyldichlorosilane (DMCS) ที่ใช้ตัวทำละลายเป็น Toluene ลงในหลอด ปิดจุกและตั้งทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง เทสารละลายทิ้งและล้างอีกครั้งด้วย Anhyd. MeOH อบแห้งที่ 110°ซ ก่อนใช้ หลังการใช้ต้องทำความสะอาดด้วย MeOH, H_2O และ MeOH ตามลำดับ ทำให้แห้งอีกครั้งที่ 100°ซ ก่อนใช้ครั้งต่อไป

2. Gas chromatography ใช้ Hydrogen flame ionization detector บน Column injection system และเป็น U-shaped glass column ขนาด 2.4 m X 3 mm ที่ pack ด้วย 0.5% Apiezon L (No.08304, Applied Science) บน Gas-Chrom Q 80-100 mesh (No.02002, Applied Science) สภาวะการควบคุม (Operating Condition) ตั้งดังนี้ Temps (°)-flash heater 275, Detector 275, Column 230, Flow rate (ml/min)-N (ultra high purity grade) ประมาณ 50, Elute Cholesterol ภายใน 9-11 นาที, flow rate ของ H ประมาณ 35, flow rate ของอากาศประมาณ 350, Electrometer sensitivity 1 X 10^{-9} amp full-scale Deflection ด้วย Recorder 1 mV

3. Homogenizer-Sorvall Omnimixer (DuPont Instument Co., Sorvall Operations, Peck's Ln, Newtown, CT 06470) ใช้สำหรับ Wide-mouth screw-cap jars ขนาด 350 ml

4. Magnetic stirrer-hot plate

5. Rotary evaporator

6. Test tube mixer-Vortex-Genie mixer (No.12-812, Fisher Scientific Co.)

วิธีทำ

1) การสกัดไขมัน

ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 0.5-1 กรัม โฮโมจีไนซ์ด้วย Anhyd. MeOH 100.0 มล. เติมน้ำลงไปโดยคำนวณให้ได้ปริมาณน้ำที่สกัดได้ทั้งหมด 40 มล. (คำนวณจากความชื้นของตัวอย่างที่มีอยู่เดิม) เติมคลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) 50 มล. ปั่น 3 นาทีด้วยความเร็วสูง (อัตราส่วนของ $CHCl_3$: MeOH : H_2O) ต้องเท่ากับ 50 : 100 : 40) เติม $CHCl_3$ ลงไปอีก 50 มล. และปั่นต่ออีก 30 วินาที ด้วยความเร็วปานกลาง หลังจากนั้นเติมน้ำลงไป 50 มล. และปั่นอีกครั้งนาน 30 วินาทีที่ความเร็วปานกลาง กรองโดยใช้ระบบสุญญากาศใส่ใน Suction flask ขนาด 1 ลิตร ใช้กระดาษกรอง Whatman No. 1 และ diatomaceous earth 2 กรัม เทสารที่กรองได้ (filtrate) ลงไปในฟลาส์กขนาด 500 มล. เอา $CHCl_3$ 90 มล. ล้าง diatomaceous earth และกระดาษกรองอีกครั้ง แล้วกรอง filtrate ซ้ำโดยปราศจาก Diatomaceous earth ล้างถ้วยที่ใส่ filtrate และ filter cake ด้วย $CHCl_3$ 15 มล. อีก 2 ครั้ง แล้วเติมสาร $CHCl_3$ ที่ได้จากการล้างรวมกับสาร filtrate ครั้งแรกจะเกิดการแยกชั้น (แต่ถ้าเกิดอิมัลชั่นให้ปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 rpm นาน 5 นาที) บันทึกปริมาณของ $CHCl_3$ (ชั้นล่าง) และดูดเอาชั้นของแอลกอฮอล์ออก (ปริมาณของ $CHCl_3$ ควรมีประมาณ 200 มล.)

2) การ Saponify และ Extract ส่วนของ Unsaponification

กรองสาร $CHCl_3$-lipid จำนวน 100 มิลลิลิตร ที่สกัดได้ใน glass funnel และเติม Anhyd. Na_2SO_4 จำนวน 25 กรัมลงไป กรองใส่บีกเกอร์ขนาด 150 มล. ล้าง Na_2SO_4 ด้วย $CHCl_3$ 15 มล. และนำไประเหยด้วยวิธี evaporation ทำให้แห้งภายใต้ไอของไนโตรเจนที่ 90°ซ โดยใช้ water bath ละลายส่วนที่ได้ใน petroleum ether 70 มล. และกรองโดยใช้กระดาษกรอง whatman No. 1 กรองใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 300 มล. แล้วเททับด้วย Na_2SO_4 20 กรัม ล้างบีกเกอร์และ Na_2SO_4 ด้วย petroleum ether 10 มล. หลาย ๆ ครั้ง ทำการระเหยภายใต้แกสของไนโตรเจนด้วยวิธี evaporation ให้ความร้อนกับสารที่ได้โดย stirrer-hot plate ระหว่างที่ปั่นช้า ๆ แล้วเติม concentrated

KOH solution 8 มล. และ reagent alcohol 40 มล. ติดตั้ง condenser และให้ความร้อนจนกระทั่ง reflux ครบ 1 ชั่วโมง ปิดสวิทซ์ hot plate แล้วเติม reagent alcohol 60 มล. ควบแน่นสารที่ saponify ได้ขณะที่ยังให้ความเย็นและ stir อยู่ เมื่อตัวอย่างสิ้นสุดการ reflux ให้ย้าย Condenser ออก ปิเปต benzene 100 มล. ลงในตัวอย่างขณะที่ยังคนอย่างช้า ๆ นำ stirring bar ออก ปิดจุกฟลาสก์ และเขย่าอย่างแรง 30 วินาที

เทส่วนที่แยกได้ใน separator ขนาด 500 มล. โดยไม่ต้องล้าง เติม 1 N KOH 200 มล. และเขย่าอย่างแรง 10 วินาที หลังจากแยกชั้นให้เทส่วนของเหลวขุ่นชั้นล่างทิ้ง ล้างชั้นของ benzene ด้วย 0.5 N KOH 40 มล. หมุนวนเบา ๆ 10 วินาที และเทของเหลวชั้นล่างทิ้ง เทชั้นของ benzene ใส่ใน separator ขนาด 250 มล. ล้างชั้นของ benzene อีกครั้งด้วยน้ำ 40 มล. หมุนวนเบา ๆ 10 ครั้ง ล้างด้วยน้ำมากกว่า 3 ครั้ง จนกระทั่งค่า pH ของน้ำล้างสุดท้ายประมาณ 7 เท benzene ที่อยู่ชั้นบนของ separator ออก แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง whatman No. 4 ที่มี Anhyd. Na_2SO_4 15 กรัม ใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 125 มล. เติม Anhyd. Na_2SO_4 ลงไปอีก 20 กรัมในสารละลาย ปิดจุกและเขย่าอย่างแรง ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

ปิเปตของเหลวที่ได้ 50 มล. ใส่ใน flask ขนาด 100 มล. และทำการระเหยด้วยวิธี evaporation โดยใช้อุณหภูมิ 40°ซ เติม acetone 3 มล. แล้วระเหยอีกครั้ง ละลายส่วนที่ได้ใน DMF จำนวน 3 มล.

<u>การวิเคราะห์ Cholesterol เทียบกับ Cholesterol Standards และ Gas Chromatographic Calibration</u>

นำสารละลาย Cholesterol standard แต่ละความเข้มข้นมา 1 มล. ใส่ในหลอด centrifuge ที่ได้ผ่านการ silanize แล้ว ขนาด 15 มล. (รักษาหลอดให้แห้งและสะอาด) เติม HMDS 0.2 มล. และ TMCS 0.1 มล. ปิดจุกและเขย่าอย่างแรงด้วย Test tube mixer ตั้งทิ้งไว้ 30 วินาที และทิ้งไว้ต่ออีก 15 นาทีโดยไม่รบกวน เติม 5α-cholestane internal standard ลงไป 1 มล. เติมน้ำในแต่ละหลอด 10 มล. เขย่าอย่างแรงนาน 1 นาที และปั่นเหวี่ยงนาน 2 นาที

ก) ดูดสาร standard หรือตัวอย่างในชั้น heptane มาจำนวน 3 µl (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ปรับสภาวะของ GC ให้ retention times ประมาณ 5 นาที สำหรับ 5α-cholestane และ 10 นาทีสำหรับ cholesterol คำนวณหาพื้นที่ของ peak โดยใช้ความสูงและความกว้าง นำไปหา standard response ratio โดยหาพื้นที่ของ cholesterol ด้วยพื้นที่ของ peak

internal standard และหาค่าเฉลี่ยของ duplicate ทำการ plot กราฟ standard response ratio (แกน Y) เทียบกับความเข้มข้นของ cholesterol (แกน X) ซึ่ง standard response ratio ควรจะมีช่วงครอบคลุมปริมาณของ cholesterol ในตัวอย่าง

ข) นำสารละลายตัวอย่างจำนวน 1 มล. ใส่ในหลอด centrifuge ที่ผ่านการ silanize แล้ว ขนาด 10 มล. ทำการ derivertization เช่นเดียวกับข้อ ก) ถ้าในตัวอย่างมี cholesterol มากกว่า standard graph ที่ทำไว้ ให้ทำการเจือจางตัวอย่าง แล้วทำ derivertization อีกครั้ง

<u>การคำนวณปริมาณ cholesterol</u>

$$\text{mg cholesterol / 100 g sample} = \frac{\text{(mg/ml cholesterol in sample from std curve X 100)}}{\text{(g/ml sample used for derivatization)}}$$

การวิเคราะห์คุณภาพด้านจุลินทรีย์

การหาปริมาณเชื้อทั้งหมด (Total Plate Count) ตามวิธีของเรณู, 2537

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

-สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (Bacto® Peptone, Difco Laboratory, USA)

ชั่งเปปโตน 0.1 กรัมในน้ำกลั่น 100 กรัม เตรียมในขวด duran ขนาด 100 มล. จำนวนขวดละ 90 มล. และใส่หลอดเลี้ยงเชื้อจำนวน 9 มล. นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Gallenkamp, England) ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที

-อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (Bacto® Plate Count Agar, Difco Laboratory, USA)

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA 23.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาณ 1 ลิตร ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Gallenkamp, England) ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.0±0.2 ที่อุณหภูมิ 25°ซ

วิธีทำ

1. สุ่มเก็บตัวอย่างไส้กรอกจำนวน 10 กรัม ด้วยวิธีปลอดเชื้อ (Aseptic technique) ใส่ในถุง Stomach bag เติมสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 90 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องตีป่นเป็นเวลา 2 นาที จะได้ความเข้มข้น 10^{-1}
2. เจือจางตัวอย่างอาหารให้ได้ความเข้มข้น 10^{-2} – 10^{-6} ด้วยสารละลายเปปโตนหลอดละ 9 มล. เขย่าให้เข้ากัน
3. ใช้ปิเปตขนาด 1 มล.ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ดูดสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ตั้งแต่ 10^{-1} – 10^{-6} จำนวนจานละ 1 มล. ลงในจานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ระดับความเจือจางละ 2 จาน โดยเริ่มดูดจากความเข้มข้นที่ต่ำสุด
4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่หลอมเหลวแล้วและมีอุณหภูมิ 45-48°ซ. ลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15-20 มล. ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับตัวอย่างโดยหมุนวนด้านซ้าย ขวา บน และล่าง อย่างละ 5 รอบ
5. บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อ (Gallenkamp, England) ที่อุณหภูมิ 37±2°ซ เป็นเวลานาน 48±3 ชั่วโมง
6. ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้ออยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี คำนวณโดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (โคโลนี/กรัม)} = \frac{\Sigma C}{V\,(n_1 + 0.1n_2)\,d}$$

ΣC คือ ผลรวมของโคโลนีที่นับได้บนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนี 30-300 โคโลนีทั้งหมด

V คือ ปริมาตรของ inoculum

n_1 คือ จำนวนจานเลี้ยงเชื้อในความเจือจางแรกที่สามารถนับได้

n_2 คือ จำนวนจานเลี้ยงเชื้อในความเจือจางที่สองที่สามารถนับได้

d คือ ความเจือจางแรกที่สามารถนับได้

การหาปริมาณยีสต์และรา (Yeast and Mold) ตามวิธีของเรณู,2537

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

-สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (Bacto® Peptone, Difco Laboratory, USA)

ชั่งเปปโตน 0.1 กรัมในน้ำกลั่น 100 กรัม เตรียมในขวด duran ขนาด 100 มล. จำนวนขวดละ 90 มล. และใส่หลอดเลี้ยงเชื้อจำนวน 9 มล. นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Gallenkamp, England) ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที

-อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (Bacto® Plate Count Agar, Difco Laboratory, USA)

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาณ 1 ลิตร ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Gallenkamp, England) ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที ปรับอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.5 โดยการสารละลายกรดตาร์ตาริกความเข้มข้นร้อยละ 10 ลงไป (อาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มล. ใช้สารละลายกรดตาร์ตาริก 1.9 มล.)

วิธีทำ

1. สุ่มเก็บตัวอย่างไส้กรอกจำนวน 10 กรัม ด้วยวิธีปลอดเชื้อ (aseptic technique) ใส่ในถุง stomach bag เติมสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 90 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องตีป่นเป็นเวลา 2 นาที จะได้ความเข้มข้น 10^{-1}

2. เจือจางตัวอย่างอาหารให้ได้ความเข้มข้น $10^{-2} - 10^{-6}$ ด้วยสารละลายเปปโตนหลอดละ 9 มล. เขย่าให้เข้ากัน

3. ใช้ปิเปตขนาด 1 มล.ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ดูดสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ตั้งแต่ 10^{-1} – 10^{-6} จำนวนจานละ 1 มล. ลงในจานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ระดับความเจือจางละ 2 จาน โดยเริ่มดูดจากความเข้มข้นที่ต่ำสุด

4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่หลอมเหลวแล้วและมีอุณหภูมิ 45-48°ซ ลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15-20 มล. ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับตัวอย่างโดยหมุนวนด้านซ้าย ขวา บน และล่าง อย่างละ 5 รอบ

5. บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อ (Gallenkamp, England) ที่อุณหภูมิ 30±2°ซ เป็นเวลานาน 72±3 ชั่วโมง

6. ตรวจนับจำนวนโคโลนีเช่นเดียวกับวิธี Total Plate Count

การหาโคลีฟอร์มและอี โคไล (Coliform and *E. coli*) โดยวิธี MPN (Most Probable Number Method) ตามวิธีของเรณู, 2537

<u>อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม</u>

-สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (Bacto® Peptone, Difco Laboratory, USA)

ชั่งเปปโตน 0.1 กรัมในน้ำกลั่น 100 กรัม เตรียมในขวด duran ขนาด 100 มล. จำนวนขวดละ 90 มล. และใส่หลอดเลี้ยงเชื้อจำนวน 9 มล. นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Gallenkamp, England) ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที

-อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptose Lauryl Sulfate Broth (LSB) (Bacto® Tryptose Lauryl sulfate broth, Difco Laboratory, USA)

ชั่งอาหาร Tryptose Lauryl Sulfate Broth จำนวน 35.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองจำนวน 10 มล. แล้วจึงใส่หลอดเดอแฮมลงไป นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Gallenkamp, England) ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที

-อาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLBB) (Bacto® Brilliant green Lactose Bile Broth , Difco Laboratory, USA)

ชั่งอาหาร Brilliant Green Lactose Bile Broth จำนวน 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองจำนวน 10 มล. แล้วจึงใส่หลอดเดอแฮมลงไป นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Gallenkamp, England) ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จะมีความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.0±0.2 ที่อุณหภูมิ 25°ซ

-อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue agar (EMB) (Bacteriological, HiMedia Laboratories Limited, India)

ชั่งอาหาร EMB จำนวน 37.5 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 1000 มล. ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Gallenkamp, England) ก่อนใช้ต้องนำมาต้มให้อาหารเดือดเพื่อให้เชื้อละลาย

-สารละลาย Tryptone water (Scharlau, Chemie S.A., European Union)

ชั่ง Tryptone จำนวน 1.5 กรัม และ NaCl จำนวน 0.5 กรัม ผสมกับน้ำจำนวน 100 กรัม บรรจุในหลอดเลี้ยงเชื้อหลอดละ 5 มล. ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Gallenkamp, England) ค่าความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.2

วิธีทำ

การตรวจแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโคลีฟอร์ม

1. ใช้กรรไกรปลอดเชื้อตัดตัวอย่างไส้กรอกจำนวน 10 กรัม เติมสารละลายเปปโตนจำนวน 90 มล. ในถุง stomach bag ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องตีปั่นนาน 2 นาที จะได้ความเข้มข้น 10^{-1}
2. เจือจางตัวอย่างอาหารให้ได้ความเข้มข้น 10^{-2} และ 10^{-3} ด้วยสารละลายเปปโตนหลอดละ 9 มล. เขย่าให้เข้ากัน
3. ใช้ปิเปตขนาด 1 มล.ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ดูดสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ตั้งแต่ 10^{-1} – 10^{-3} จำนวน 1 มล. ลงในอาหาร LSB จำนวน 10 มล. ความเข้มข้นละ 3 หลอด รวมเป็น 9 หลอด
4. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37±1°ซ นาน 48 ชั่วโมง หากหลอดเลี้ยงเชื้อมีแก๊สเกิดขึ้น (สังเกตจากหลอดเดอเฮมหรือหลอดดักแก๊ส) แสดงว่าให้ผลเป็นบวก ซึ่งคาดว่าจะมีโคลีฟอร์มเจริญในตัวอย่างไส้กรอก ให้ทำการยืนยันผลต่อไป

การยืนยันโคลีฟอร์ม

1. ใช้ห่วง (loop) เขี่ยเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อที่ให้ปฏิกิริยาเป็นบวกจากการทดสอบแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโคลีฟอร์ม ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BGLBB จำนวน 10 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37±1°ซ นาน 24-48 ชั่วโมง
2. สังเกตหลอดที่ให้ผลบวก คำนวณหาปริมาณโคลีฟอร์มได้จากตารางแมคคราดี (ตารางที่ ค.2) รายงานผลเป็น MPN/กรัม แล้วทำการยืนยัน *E.coli* ต่อไป

การยืนยัน *E.coli*

1. ใช้ห่วง (loop) เขี่ยเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อที่ให้ปฏิกิริยาเป็นบวกจากการทดสอบยืนยันว่าเป็นโคลีฟอร์ม ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BGLBB จำนวน 10 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 44.5±0.5°ซ นาน 24-48

ชั่วโมง และเขี่ยเชื้อจากหลอดเดียวกัน steak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง

2. สังเกตหลอดที่ให้ผลบวกในอาหาร BGLBB ทำการยืนยันผลอีกครั้งตามข้อ 3 และสังเกตโคโลนีของเชื้อบนอาหาร EMB ซึ่งจะมีลักษณะโคโลนีสีม่วงขนาด 2-4 nm มี Metalic sheen รอบโคโลนี ถ้าสังเกตเห็นโคโลนีลักษณะดังกล่าวให้ทำการย้อมสีแกรมเพื่อยืนยัน *E.coli* ซึ่งจะติดสีแกรมลบและเป็นแท่งสั้น

3. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ 1 loop จากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ BGLBB ที่ให้ผลบวกลงบน Tryptone water จำนวน 5 มล. บ่มที่ 37°ซ และ 44°ซ นาน 24-48 ชั่วโมง ทำการทดสอบ Indole ผลจากการตรวจสอบสามารถยืนยันได้จากตารางที่ ค.1

ตารางที่ ค.1 แสดงคุณสมบัติของเชื้อ Coliform และ *E.coli*

	Gas in BGLBB 37°C	Gas in BGLBB 44°C	Indole
Coliform	+	-	+ or -
E.coli	+	+	+

ที่มา : Roberts *et al* (1995)

4. บันทึกจำนวนหลอดที่มี *E.coli* คำนวณหาปริมาณของ *E.coli* ตามตารางแมคคราดี (ตารางที่ ค.2) รายงานผลเป็น MPN/กรัม

5. ทำการทดสอบผลเพิ่มเติมเกี่ยวกับ Coliform และ *E.coli* โดยทดสอบเมทิลเรด (Methyl red) โวเกส-พรอสเกาเออร์ (Voges-Proskauer) และซิเตรต (Citrate test) ประเมินผลดังตารางที่ ค.3

ตารางที่ ค.2 ตารางแมคคราดีแสดงปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรียที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สำหรับความเจือจาง 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม ระดับละ 3 หลอด

จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก			
0.1 กรัม	**0.01 กรัม**	**0.001 กรัม**	**MPN/กรัม**
0	0	0	<3
0	1	0	3+
1	0	0	4
1	0	1	7+
1	1	0	7
1	2	0	11+
2	0	0	9
2	0	1	14+
2	1	0	15
2	1	1	20+
2	2	0	21
3	0	0	23
3	0	1	39
3	1	0	43
3	1	1	75
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210+
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	>1100

ที่มา : Vanderzant and Splittstoesser (1992)

ตารางที่ ค.3 แสดงคุณสมบัติของเชื้อชนิดต่าง ๆ ในการทดสอบ IMViC

	Indole	Methyl Red	Voges-Proskauer	Citrate
E.coli	+/-	+	-	-
Citrobacter	-	+	-	+
Klebsiella-Enterobacter	-/+	-	+	+

ที่มา : เรณู (2537)

การตรวจหาจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิต่ำและปานกลาง (มอก.335 เล่ม1-2523)

นำตัวอย่างไส้กรอกจำนวน 2 กรัมที่บดละเอียด เพาะลงบนอาหาร cook meat medium (อาหารชนิดนี้ต้องต้มไล่อากาศก่อนนำมาใช้) แบ่งไปต้มที่ 80°ซ นาน 20 นาที จำนวน 2 หลอด อีก 2 หลอดไม่ต้องต้ม เททับด้วย agar 2% ที่ผสมเมทธิลีนบลู ใส่ใน anaerobic jar และใส่ Gas pak เพื่อให้เกิดสภาวะสุญญากาศ บ่มที่อุณหภูมิ 7±1°ซ นาน 10 วัน สำหรับจุลินทรีย์ที่เจริญในอุณหภูมิต่ำ และบ่มที่ 32°ซ นาน 5-6 วัน สำหรับจุลินทรีย์ที่เจริญในอุณหภูมิปานกลาง

ภาคผนวก ง
ข้อมูลทางสถิติ

ตัวอย่างการคำนวณค่า Effect (ปัจจัย)

$$\text{Effect (ปัจจัย)} = \frac{\text{(ผลรวมของผลที่เกิดจากการใช้ปัจจัยในระดับสูง)}}{6} - \frac{\text{(ผลรวมของผลที่เกิดจากการใช้ปัจจัยในระดับต่ำ)}}{6}$$

$$\text{Effect ของอังคักต่อสี} = \frac{(1.24+1.17+1.19+1.23+1.25+1.27)}{6} - \frac{(1.19+1.23+1.03+1.25+0.90+0.78)}{6}$$

$$= 0.307$$

$$\text{Effect (Dummy 1)} = \frac{(1.19+1.03+0.89+1.03+1.25+1.27)}{6} - \frac{(1.24+1.17+0.88+1.23+0.90+0.78)}{6}$$

$$= 0.077$$

Effect (Dummy 2) = 0.053

Effect (Dummy 3) = 0.010

Effect (Dummy 4) = -0.007

$$\text{S.E. (Effect)} = (\sum d^2/n)^{1/2}$$

$$\text{S.E. (อังคัก)} = ((0.077^2+0.053^2+0.010^2+(-0.007)^2)/4)^{1/2}$$

$$= 0.0471$$

$$\text{t value} = \text{Effect} / \text{S.E. (Effect)}$$

$$= 0.307 / 0.0471$$

$$= 6.514$$

ค่า t table ที่ df เท่ากับ 4 ที่ระดับความเชื่อมั่น 75, 80, 85, 90 และ 95 มีค่าเท่ากับ 1.344, 1533, 1.778, 2.132 และ 2.776 ตามลำดับ (ดังตาราง ง.4)

เมื่อเทียบ t value กับ t table พบว่าอังคักมีผลต่อคุณลักษณะด้านสีของไส้กรอกที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตัวอย่างการวิเคราะห์ Stepwise regression analysis (โดยใช้ SX 4.0)

ทำการป้อนข้อมูลโดยสร้างตัวแปรให้ครบจำนวนและป้อนในแนวคอลัมน์ ระดับของตัวแปรต่าง ๆ จะใช้รหัส (Coded) แทนและสร้างตัวแปรสำหรับกำลังสอง (Transform) ได้แก่ C2 แทน C^2, T2 แทน T^2 และ CT แทน CXT ดังนี้

	C	T	Cooking yield
1	70	5	99.44
2	90	5	98.17
3	70	20	99.74
4	90	20	99.02
5	80	12.5	98.84
6	80	12.5	98.86
7	80	12.5	98.52

หมายเหตุ : เมื่อ C แทน อุณหภูมิ; T แทน เวลา

ในการวิเคราะห์ผลจะต้องเลือกเมนู Stepwise Regression...ใส่ตัวแปรตามคือ Cooking yield และตัวแปรอิสระคือ C, T, C2, T2, CT เพื่อให้โปรแกรมทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระและตัวแปรตาม ซึ่งจะได้ว่า Cooking yield = 102.5890-0.0496(C)+ 0.0017(T2) และค่า R^2 เท่ากับ 0.7594

หลังจากที่ได้สมการทำนายค่า Cooking yield แล้ว จะต้องนำสมการดังกล่าวมาแทนค่าเพื่อหาค่า Cooking yield สูงที่สุด ซึ่งจากการแทนค่าลงในสมการพบว่า เมื่อใช้อุณหภูมิในการต้มเท่ากับ 70°ซ นาน 20 นาที จะทำให้ได้ค่า Cooking yield เท่ากับ 99.80% ที่ความเชื่อมั่น 75.94%

ตารางที่ ง.1 แสดงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นหืนของไส้กรอกที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10°ซ นาน 4 สัปดาห์ โดยวิธี Analysis of variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment (A)	4	3912	978	1.17	0.3409
Block (B)	9	3952	439.11	0.52	0.8468
A * B	36	30128	836.89		
Total	49	37992			
Grand average	1	4608			

ตารางที่ ง.2 แสดงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นแปลกปลอมของไส้กรอกที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10°ซ นาน 4 สัปดาห์ โดยวิธี Analysis of variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment (A)	4	10508	2627.0	1.86	0.1391
Block (B)	9	24258	2695.3	1.91	0.0825
A * B	36	50892	1413.7		
Total	49	85658			
Grand average	1	24642			

ตารางที่ ง.3 แสดงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านรสเปรี้ยวของไส้กรอกที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10°ซ นาน 4 สัปดาห์ โดยวิธี Analysis of variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment (A)	4	7428	1857	1.19	0.3325
Block (B)	9	17608	1956.4	1.25	0.2959
A * B	36	56252	1562.6		
Total	49	81288			
Grand average	1	8712			

ตารางที่ ง.4 แสดง The distribution of t

The Distribution of t* (Two-tailed Tests)

Degrees of Freedom	Probability of a Larger Value. Sign Ignored								
	0.500	0.400	0.200	0.100	0.050	0.025	0.010	0.005	0.001
1	1.000	1.376	3.078	6.314	12.706	25.452	63.657		
2	0.816	1.061	1.886	2.920	4.303	6.205	9.925	14.089	31.598
3	.765	0.978	1.638	2.353	3.182	4.176	5.841	7.453	12.941
4	.741	.941	1.533	2.132	2.776	3.495	4.604	5.598	8.610
5	.727	.920	1.476	2.015	2.571	3.163	4.032	4.773	6.859
6	.718	.906	1.440	1.943	2.447	2.969	3.707	4.317	5.959
7	.711	.896	1.415	1.895	2.365	2.841	3.499	4.029	5.405
8	.706	.889	1.397	1.860	2.306	2.752	3.355	3.832	5.041
9	.703	.883	1.383	1.833	2 262	2.685	3.250	3.690	4.781
10	.700	.879	1.372	1.812	2.228	2.634	3.169	3.581	4.587
11	.697	.876	1.363	1.796	2.201	2.593	3.106	3.497	4.437
12	.695	.873	1.356	1.782	2.179	2.560	3.056	3.428	4.318
13	.694	.870	1.350	1.771	2.160	2.533	3.012	3.372	4.221
14	.692	.868	1.345	1.761	2.145	2.510	2.977	3.326	4.140
15	.691	.866	1.341	1.753	2.131	2.490	2.947	3.286	4.073
16	.690	.865	1.337	1.746	2.120	2.473	2.921	3.252	4.015
17	.689	.863	1.333	1.740	2.110	2.458	2.898	3.222	3.965
18	.688	.862	1.330	1.734	2.101	2.445	2.878	3.197	3.922
19	.688	.861	1.328	1.729	2.093	2.433	2.861	3.174	3.883
20	.687	.860	1.325	1.725	2.086	2.423	2.845	3.153	3.850
21	.686	.859	1.323	1.721	2.080	2.414	2.831	3.135	3.819
22	.686	.858	1.321	1.717	2.074	2.406	2.819	3.119	3.792
23	.685	.858	1.319	1.714	2.069	2.398	2.807	3.104	3.767
24	.685	.857	1.318	1.711	2.064	2.391	2.797	3.090	3.745
25	.684	.856	1.316	1.708	2.060	2.385	2.787	3.078	3.725
26	.684	.856	1.315	1.706	2.056	2.379	2.779	3.067	3.707
27	.684	.855	1.314	1.703	2.052	2.373	2.771	3.056	3.690
28	.683	.855	1.313	1.701	2.048	2.368	2.763	3.047	3.674
29	.683	.854	1.311	1.699	2.045	2.364	2.756	3.038	3.659
30	.683	.854	1.310	1.697	2.042	2.360	2.750	3.030	3.646
35	.682	.852	1.306	1.690	2.030	2.342	2.724	2.996	3.591
40	.681	.851	1.303	1.684	2.021	2.329	2.704	2.971	3.551
45	.680	.850	1.301	1.680	2.014	2.319	2.690	2.952	3.520
50	.680	.849	1.299	1.676	2.008	2.310	2.678	2.937	3.496
55	.679	.849	1.297	1.673	2.004	2.304	2.669	2.925	3.476
60	.679	.848	1.296	1.671	2.000	2.299	2.660	2.915	3.460
70	.678	.847	1.294	1.667	1.994	2.290	2.648	2.899	3.435
80	.678	.847	1.293	1.665	1.989	2.284	2.638	2.887	3.416
90	.678	.846	1.291	1.662	1.986	2.279	2.631	2.878	3.402
100	.677	.846	1.290	1.661	1.982	2.276	2.625	2.871	3.390
120	.677	.845	1.289	1.658	1.980	3.270	2.617	2.860	3.373
∞	.6745	.8416	1.2816	1.6448	1.9600	2.2414	2.5758	2.8070	3.2905

*Parts of this table are reprinted by permission from R.A. Fisher's *Statistical Methods for Research Workers*, published by Oliver and Boyd. Edinburgh (1925-1950) from Maxine Merrington's "Table of Percentage Points of the t-Distribution," Biometrika, 32:300 (1942); and from Bernard Ostle's *Statistics in Research*. Iowa State University Press (1954).

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวพัชรีย์ พัฒนากูล
วัน เดือน ปี เกิด	1 มกราคม 2521
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนบุญเหลือวิทยานุสรณ์ นครราชสีมา ปีการศึกษา 2538 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีอาหาร นครราชสีมา ปีการศึกษา 2542
ทุนการศึกษา	ได้รับทุนอุดหนุนการทำวิจัย คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ งบประมาณประจำปี 2544
ผลงานวิจัยที่ได้รับการเผยแพร่	เรณู ปิ่นทอง, ลักขณา รุจนะไกรกานต์ และพัชรีย์ พัฒนากูล. 2543. การผลิตไส้กรอกหมูโดยใช้อังคักช่วยเพิ่มสี. *แก่นเกษตร*. 28(2): 89-96.