ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์

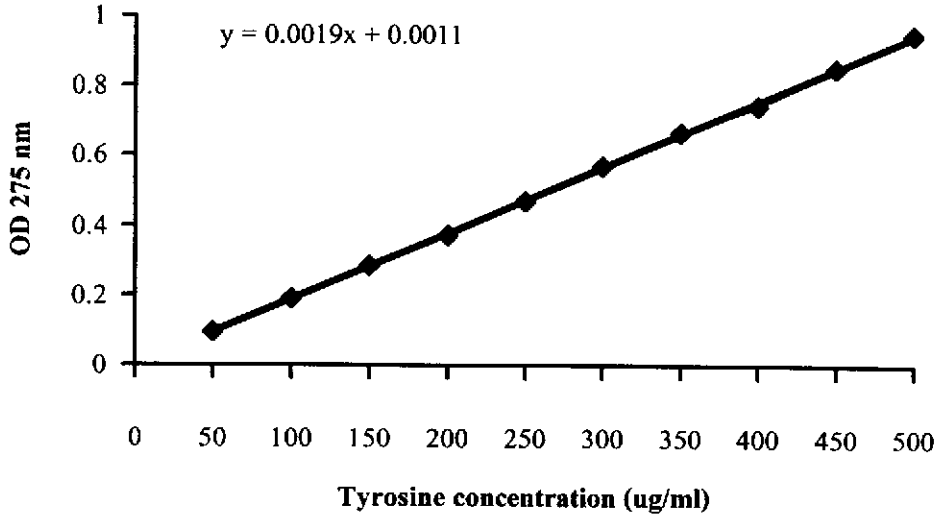
1. การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (Hagihara *et al.*, 1958)

1. ชั่งไทโรซีน 10 มิลลิกรัม (ผลิตโดย Fluka) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้คือสารละลายไทโรซีน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเก็บไว้เป็น stock solution

2. เตรียมสารละลายไทโรซีนเข้มข้น 50 100 150 200 250 300 350 400 450 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร

4. เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไทโรซีนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร (ภาพภาคผนวกที่ ก1)



ภาพภาคผนวกที่ ก1 กราฟมาตรฐานไทโรซีน

Figure-Appendix A1 Standard curve of tyrosine

2. ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (soluble protein) โดยวิธี Lowry และคณะ (1951)

สารเคมี

A= สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตร้อยละ 2 ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 นอร์มอล

B= สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) ร้อยละ 0.5

C= สารละลายโซเดียมโพแตสเซียมทาร์เทรตร้อยละ 1

D= สารผสมระหว่าง A:B:C ในอัตราส่วน 98:1:1 (ผสมก่อนใช้)

E= สารผสมระหว่าง Folin-ciocateau reagent และน้ำในอัตราส่วน 1:1 (ผสมก่อนใช้)

วิธีการ

1. นำสารละลายตัวอย่างที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.2 มิลลิลิตร เติมสารผสม D 2.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

2. เติมสารผสม E 0.2 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ BSA (ภาพภาคผนวกที่ ก2)

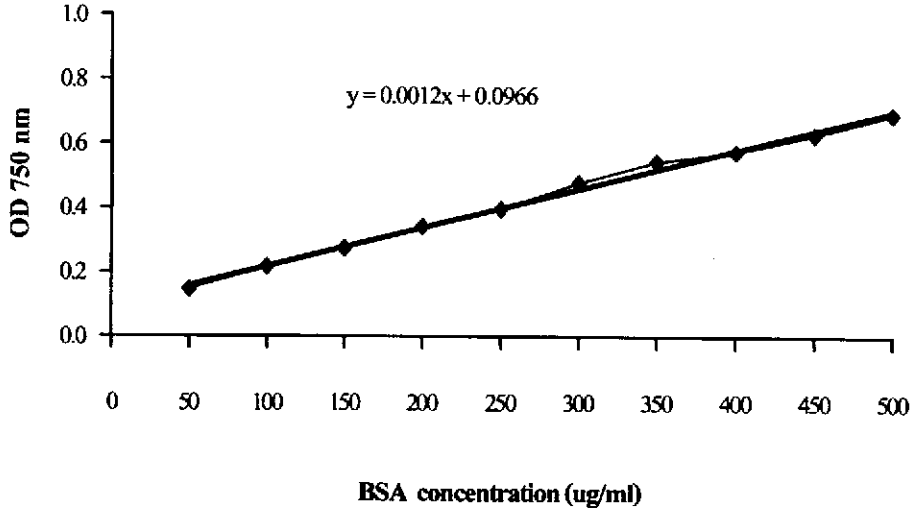
การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. ชั่งสาร BSA 100 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้คือสารละลาย BSA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้เป็น stock solution

2. เจือจางสารละลาย BSAให้อยู่ในช่วง 50-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. นำไปหาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้โดยวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

4. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร



ภาพภาคผนวกที่ ก2 กราฟมาตรฐาน BSA

Figure-Appendix A2 Standard curve of BSA

3. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ดัดแปลงจาก AOAC, 1990)

อุปกรณ์

1. ขวดย่อยโปรตีน (Kjeldahl flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร
3. บิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร
4. ชุดย่อยโปรตีน ประกอบด้วย เตาย่อย (heat) และเครื่องจับไอกรด (scrubber)
5. ชุดกลั่นโปรตีน Kjeltech system distilling unit รุ่น Model 2000 ของบริษัท Tecator จำกัด

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
2. สารเร่งปฏิกิริยา ซึ่งเป็นสารผสมระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$)และโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4)อัตราส่วน 1:9
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 20% และ 60% (โดยน้ำหนัก)
4. สารละลายกรดบอริกเข้มข้น 4% (โดยน้ำหนัก)

5. สารละลายกรดเกลือเข้มข้น 0.1% (โดยปริมาตร) (ภาคผนวก ข)

6. อินดิเคเตอร์ผสมระหว่าง เมทิลเรด เมทิลีนบลู และโบรโมครีซอลกรีน (ภาคผนวก ข)

วิธีวิเคราะห์

ขั้นตอนการย่อย

1. ชั่งตัวอย่าง (ของแข็ง) ให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 0.5-1 กรัม (ตัวอย่างของเหลวใช้ปริมาตร 1-10 มิลลิลิตร) ใส่ลงในขวดย่อยโปรตีน ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนที่ตัวอย่าง

2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา 5 กรัม

3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 20 มิลลิลิตร

4. วางหลอดย่อยในเตาย่อย แล้วประกอบสายยางระหว่างฝาครอบ ขวดใส่ด่างที่มีสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 20% 500-600 มิลลิลิตร และเครื่องจับไอกรดให้เรียบร้อย

5. เปิดเครื่องจับไอกรดและเตาย่อย แล้วตั้งอุณหภูมิเป็น 350 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ย่อยจนได้สารละลายใส ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น

ขั้นตอนการกลั่น

1. เปิดสวิทช์ชุดกลั่นโปรตีน และน้ำหล่อเย็น

2. กลั่นล้างเครื่องด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

3. นำขวดย่อยโปรตีนต่อเข้ากับชุดกลั่นโปรตีน เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40% 60 มิลลิลิตร

4. นำขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีการเติมกรดบอริก 4% 20 มิลลิลิตร และเติมอินดิเคเตอร์ 3-4 หยด ไปรองรับของเหลวที่จะกลั่นออกมาโดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลาย

5. กลั่นโดยใช้เวลาประมาณ 4 นาที

6. ไตเตรตสารละลายที่กลั่นได้กับสารละลายกรดเกลือเข้มข้น 0.1% สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \frac{(a-b) \times N \times 1.4007}{w}$$

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{(a-b) \times N \times 1.4007 \times F}{w}$$

โดยที่ a = ปริมาตรของสารละลายกรดเกลือที่ใช้ไตเตรตกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

b = ปริมาตรของสารละลายกรดเกลือที่ใช้ไตเตรตกับ blank (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือ (นอร์มอล)

W = น้ำหนักหรือปริมาตรของตัวอย่างเริ่มต้น (กรัมหรือมิลลิลิตร)

F = แฟกเตอร์ที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณโปรตีนสำหรับอาหารชนิดต่างๆ

(แฟกเตอร์ที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณโปรตีนสำหรับผลิตภัณฑ์จากปลาเท่ากับ 6.25)

4. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น โดยวิธีตู้อบไฟฟ้า (AOAC, 1990)

อุปกรณ์

1. ตู้อบไฟฟ้า (electric oven)
2. โถดูดความชื้น (desiccator)
3. ภาชนะอะลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น (moisture can)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดละเอียด 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่งโมง แล้วนำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

2. กระทำเช่นข้อ 1 ซ้ำจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกัน ไม่เกิน 1 –3 มิลลิกรัม

3. ชั่งตัวอย่างอาหารที่ต้องการหาความชื้นให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1-3 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักแล้วนำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่งโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น แล้วชั่งภาชนะพร้อมตัวอย่างนั้น จากนั้นนำกลับเข้าตู้อบอีก และกระทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

5. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน Crude fat (AOAC, 1990)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (Soxlet apparatus) ประกอบด้วยขวดกลมใส่ตัวทำละลายซอคเลต (soxlet) เครื่องควบแน่น (condensate) และเตาให้ความร้อน (heating mantus)

2. หลอดใส่ตัวอย่าง (extraction thimble)

3. ตู้อบไฟฟ้า

4. เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด

5. โถดูดความชื้น

6. สำลี

7. กระดาษกรอง

สารเคมี

1. ปิโตรเลียมอีเทอร์

วิธีการ

1. อบขวดกลมสำหรับหาปริมาณไขมันซึ่งมีปริมาณความจุ 250 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้าทิ้งไว้ในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ประมาณ 1-2 กรัม ห่อให้มิดชิด และใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยสำลีเพื่อให้สารตัวทำละลายมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ

3. นำหลอดตัวอย่างใส่ลงในซอคเลต

4. เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลี่ยมอีเทอร์ (จุดเดือด 40-60 องศาเซลเซียส) ลงในขวดหาไขมันปริมาณ 150 มิลลิลิตร และวางบนเตาให้ความร้อน

5. ทำการสกัดไขมันเป็นเวลา 14 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของตัวทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 150 หยดต่อนาที

6. เมื่อครบ 14 ชั่วโมง นำหลอดใส่ตัวอย่าวออกจากซอคเลต และกลั่นเก็บสารทำละลายจนเหลือสารละลายในขวดกลมเล็กน้อยด้วยเครื่องกลั่นแบบลดความดัน

7. นำขวดไขมันนั้นไปในไปในตู้อบที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส จนแห้ง ทิ้งให้ไดเย็นในโถดูดความชื้น

8. ชั่งน้ำหนักและอบซ้ำครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 กรัม

การคำนวณ

ปริมาณไขมัน (ร้อยละ) = 100 x [น้ำหนักไขมันหลังอบ/น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น]

6. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC, 1990)

อุปกรณ์

1. เตาเผา (muffle fumace)
2. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (porcelain crucible)
3. โถดูดความชื้น (desiccator)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดละเอียด 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องสาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง รอประมาณ 30-45 นาที เพื่อให้อุณหภูมิในเตาลดลงก่อน แล้วนำออกจากเตาเผาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นถึงอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

2. เผาซ้ำอีกครั้งๆ ละ ประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปเผาในตู้ดวันจนหมดควัน แล้วจึงนำเข้าเตาเผาอุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียสและกระทำเช่นเดียวกับข้อ 1-2

การคำนวณ

ปริมาณเถ้า (ร้อยละ) = 100 x [น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา/น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น]

7. การวิเคราะห์ปริมาณสารเยื่อใย (AOAC, 1990)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ชุดหาปริมาณสารเยื่อใย (VELP)
2. ตู้อบไฟฟ้า
3. เตาเผา
4. โถดูดความชื้น
5. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก เข้มข้นร้อยละ 1.25
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้นร้อยละ 1.25
3. n-octanol (ใช้เป็น antiform)
4. anhydrous acetone

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนอย่างละเอียด ประมาณ 1 กรัม ลงในครูซิเบิล
2. วางครูซิเบิลในอุปกรณ์ฯ พร้อมทั้งเปิดน้ำหล่อเย็น
3. เติมกรดซัลฟูริก (ซึ่งผ่านการให้ความร้อน) ปริมาณ 150 มิลลิลิตรลงไปในคอลัมณ์ แล้วเติม n-octanol ลงไป 3-4 หยด
4. ต้มจนเดือดเป็นเวลา 30 นาที
5. ปล่อยกรดซัลฟูริกทิ้งโดยการกรอง (เปิดสวิทช์สูญญากาศที่ตัวอุปกรณ์ฯ)
6. ล้างด้วยน้ำปราศจากอิออนซึ่งถูกทำให้ร้อน ปริมาณครั้งละ 30 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง
7. เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ซึ่งผ่านการให้ความร้อน) ปริมาณ 150 มิลลิลิตร พร้อมทั้ง 3-5 หยดของ n-octanol
8. ต้ม 30 นาที แล้วกรองเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 6 และ 7
9. ล้างด้วยอะซิโตน ครั้งละ 25มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง
10. นำครูซิเบิลออกจากอุปกรณ์ ไปอบแห้งในตู้อบไฟฟ้าอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่
11. นำครูซิเบิลไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วเผาซ้ำจนน้ำหนักคงที่

คำนวณ

$$\text{ปริมาณสารเยื่อใยคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{100 \times \text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างหลังอบและหลังเผา}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

8. การวิเคราะห์ค่าพลังงานในอาหาร (โดยใช้เครื่อง Bomb Calorie Meter)

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. crucible สำหรับใส่ตัวอย่าง
3. crucible holder
4. firing cotton
5. bomb
6. เครื่องอัดเม็ดอาหาร

วิธีการ

1. นำตัวอย่างที่แห้งมาบดให้ละเอียดแล้วนำไปอัดเม็ดด้วยเครื่องอัดเม็ดอาหาร เม็ดละ 0.25-0.50 กรัม
2. นำตัวอย่างใส่ crucible
3. เปิดฝาหัว bomb นำ firing cotton ไปผูกกับ ignition wire
4. แขวน crucible เข้ากับ crucible holder
5. หย่อนปลาย firing cotton ลงไปใน crucible เอาเม็ดตัวอย่างวางทับ firing cotton เอาไว้
6. ปิดฝาหัว bomb ให้สนิท
7. นำหัว ใส่เข้าไปในเครื่อง
8. กดปุ่ม start รอประมาณ 20 นาที เครื่องจะ bomb เสร็จและยกฝาขึ้น
9. อ่านค่าได้จากจอ monitor (J/g)
10. นำหัว bomb ออกทำความสะอาดและใช้งานต่อไป