ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การวิเคราะห์องประกอบทางเคมี

1. การวิเคราะห์ความชื้น (AOAC, 1999)

วิธีการ

1.อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้จนอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมฝาจนน้ำหนักคงที่มีค่าแตกต่างของน้ำหนักไม่เกิน 3 มิลลิกรัม

2.ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 5 กรัมใส่ในภาชนะสำหรับหาความชื้น และเขี่ยตัวอย่างให้กระจายออกด้วย spatula

3. นำภาชนะสำหรับหาความชื้นพร้อมตัวอย่างใส่ในตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หรือ ข้ามคืน

4. หลังจากตัวอย่างแห้ง นำภาชนะสำหรับหาความชื้นที่ปิดฝาใส่ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมตัวอย่าง จากนั้นนำกลับไปเข้าตัวอย่างตู้อบอีกครั้ง และกระทำซ้ำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}}$$

2. การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า (AOAC, 1999)

วิธีการ

1.เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบพร้อมฝาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่ติดอยู่ที่ผิวของกระเบื้องเคลือบ นำออกจากเตาเผาใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น

2. ชั่งน้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบพร้อมฝาด้วยตาชั่งละเอียดทศนิยม 3 ตำแหน่ง

3. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 5 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบ นำไปเผาในตู้ควันจนหมดควัน นำถ้วยกระเบื้องเคลือบพร้อมตัวอย่างใส่ในเตาเผา

4. ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ในระหว่างการให้ความร้อน ห้ามปิดฝา เมื่อให้ความร้อนเสร็จแล้วจึงค่อยปิดฝาเพื่อป้องกันเถ้าสูญหาย นำออกมาทำให้เย็นในโถดูดความชื้น

5. ชั่งน้ำหนักเถ้าพร้อมถ้วยกระเบื้องเคลือบและฝา

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

3. **การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน** (AOAC, 1999)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
2. สารเร่งปฏิกิริยา : คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) 1ส่วน ต่อ โปแตสเซียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (K_2SO_4) 9 ส่วน
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักโดยปริมาตร)
4. สารละลายกรดเกลือเข้มข้น 0.02 นอร์มอล
5. สารละลายกรดบอริก (H_3BO_3) เข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักโดยปริมาตร)
6. สารละลายอินดิเคเตอร์ : นำเมทิลเรด (methyl red) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ผสมกับโบรโมคลีซอลกรีน (bromocresol green) ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ในสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาณ 200 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างปริมาณ 0.5-1.0 กรัม ใส่ในขวดย่อยโปรตีน
2. เติมสารเร่งปฏิกิริยาปริมาณ 5 กรัม และ กรดซัลฟูริกเข้มข้น 200 มิลลิลิตร
3. นำไปย่อยบนเตาย่อยโปรตีนจนได้สารละลายสีฟ้าใส
4. ทิ้งไว้ให้เย็นและเติมน้ำกลั่นปริมาณ 60 มิลลิลิตร
5. จัดอุปกรณ์กลั่น
6. นำขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร และเติมสารละลายกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักโดยปริมาตร) 5 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และเติมอินดิเคเตอร์ 5-

7 หยด เรียบร้อยแล้วรองรับของเหลวที่กลั่นได้โดยให้ส่วนปลายของอุ)กรณ์ควบแน่นจุ่มอยู่ในสารละลายกรด ให้ความร้อนจนแอมโมเนีย (NH_3) ถูกกลั่นจนหมด

7. นำขวดรูปชมพู่ออกแล้วล้างปลายของอุปกรณ์ควบแน่นด้วยน้ำกลั่นลงในขวดไตเตรทสารละลายที่กลั่นได้ด้วยสารละลายกรดเกลือเข้มข้น 0.02 นอร์มอล
8. ทำ blank ด้วยวิธีการเช่นเดียวกันตั้งแต่ข้อ 2-7

<u>การคำนวณ</u>

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{(a-b) \times N \times 14.007 \times Factor}{W}$$

โดยที่

a = ปริมาณสารละลายกรดเกลือที่ใช้หน่วยเป็นมิลลิลิตร

b = ปริมาณสารละลายกรดเกลือที่ใช้กับ blank เป็นมิลลิลิตร

N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือหน่วยเป็นนอร์มอล

W = น้ำหนักตัวอย่างหน่วยเป็นกรัม

14.007 = น้ำหนักสมมูลย์ของไนโตรเจน

Factor = 6.25

4. **การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน** (AOAC, 1999)

<u>วิธีการ</u>

1. อบขวดก้นกลมสำหรับหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีความจุขนาด 250 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้าทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักประมาณ 1-2 มิลลิกรัม ห่อให้มิดชิดแล้วใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยสำลีเพื่อให้สารทำละลายมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ
3. นำหลอดตัวอย่างใส่ในซอคเลต
4. เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ ลงในขวดหาไขมันปริมาณ 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตาให้ความร้อน
5. ทำการสกัดไขมันเป็นเวลา 14 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 150 หยด ต่อนาที

6. เมื่อครบ 14 ชั่วโมง นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอคเลตและกลั่นกับสารทำละลายจนเหลือสารละลายในขวดก้นกลมเพียงเล็กน้อยด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลาย
7. นำขวดหาไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส จนแห้ง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
8. ชั่งน้ำหนักแล้วอบซ้ำครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนัก 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

<u>การคำนวณ</u>

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

5. **การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรต** (AOAC, 1999)

ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ) = 100 - ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ) - ปริมาณไขมัน (ร้อยละ) - ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)

6. **การวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งทั้งหมด** (AOAC, 1999)

<u>วิธีการ</u>

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 2.5-3.0 กรัม ลงในถ้วยกระเบื้องปากกว้าง (flat-bottom dish) ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางกว้างมากกว่าหรือเท่ากับ 5 เซนติเมตร ให้ความร้อนบนอ่างกำเนิดไอน้ำ (steam bath) นาน 10-15 นาที โดยให้ผิวของถ้วยกระเบื้องสัมผัสกับไอน้ำมากที่สุด จากนั้นให้ความร้อนต่อในตู้อบอุณหภูมิ 98-100 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง นำมาใส่ไว้ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนักทันที ปริมาณของแข็งทั้งหมดคิดเป็นร้อยละของปริมาณของแข็งที่เหลืออยู่ในถ้วยกระเบื้อง

7. **การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเรท** (Copeland, 1994)

<u>สารเคมี</u>

1. สารละลายโปรตีนมาตราฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. สารละลายไบยูเรท : ชั่ง $CuSO_4.5H_2O$ 1.5 กรัม โซเดียมโพแตสเซียมทาเตรท 6.0 กรัม เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร กวนจนเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสาร

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 10 จำนาน 30 มิลลิลิตร ในขณะกวน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

<u>วิธีการ</u>

1. ดูดสารละลายโปรตีน 200 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น 300 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลายไบยูเรท 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vertex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตราฐาน BSA ดังรูปภาคผนวกที่1 ปริมาณโปรตีนคำนวณโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หารด้วยค่าความชันที่ได้จากกราฟมาตราฐาน BSA

ภาพประกอบภาคผนวกที่1 กราฟมาตราฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีน โดยใช้ Bovine Serum Albumin เป็นสารละลายโปรตีนมาตราฐาน

โดยมีวิธีการเตรียมโปรตีนมาตราฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) ดังนี้

ดูดสารละลาย BSA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 200 300 400 และ 500 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 ไมโครลิตร เติมสารละลายไบยูเรท 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vertex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

8. การวัดเนื้อสัมผัสโดยใช้เครื่อง TA-Xt2 Texture Analyzer (Bourne, 1978)

<u>วิธีการเตรียมตัวอย่าง</u>

ตัดตัวอย่างด้วยใบมีดสแตนเลสวงกลมให้มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 26 มิลลิเมตร สูง 10 มิลลิเมตร โดยกำหนดให้ใช้ loading cell น้ำหนัก 2 กิโลกรัม ความเร็วหัวกด 1 มิลลิเมตรต่อวินาที ใช้หัวกด Cylinder เส้นผ่านศูนย์กลาง ... มิลลิเมตร

<u>วิธีการใช้เครื่อง TA-Xt2 Texture Analyzer</u>

1. เสียบปลั๊กเครื่องสำรองไฟ เปิดสวิทย์เครื่องมาที่ตำแหน่ง on อุปกรณ์เครื่องวัดเนื้อสัมผัสซึ่งประกอบด้วย ฐานทดสอบ (test base) และคอมพิวเตอร์ควบคุมการทำงานต่อพ่วงเข้ากับเครื่องสำรองไฟนี้
2. เปิดคอมพิวเตอร์ และเปิดสวิทย์ฐานทดสอบซึ่งอยู่ด้านหลังเครื่อง
3. เข้าสู่โปรแกรมการทำงานของเครื่องโดย
    3.1 คลิกเมาส์ที่ Program
    3.2 เลือก Texture expert ซึ่งจะปรากฏโปรแกรมย่อย คลิกเมาส์ที่ Texture expert English
4. หน้าต่างใหม่ที่ปรากฏขึ้นจะถามชื่อผู้ใช้ เลือกชื่อแล้วตอบ OK
5. เริ่มการทำงานเข้าสู่โปรแกรมการทำงานภายใต้โปรแกรม Project คลิกเมาส์ที่ Restart
6. หน้าต่างใหม่ประกอบด้วยแถบคำสั่งต่างๆ คลิกเมาส์ที่แถบคำสั่ง T.A.
7. ทดสอบการทำงานของเครื่อง 2 ครั้ง
    7.1 Force calibration

    เลือก T.A. บนแถบคำสั่ง แล้วเลือก Calibrate force หน้าต่างใหม่จะเตือนให้ผู้ใช้ตรวจสอบว่ามีวัตถุใดๆ กีดขวางหัววัดหรือไม่ถ้าไม่มีสิ่งกีดขวางตอบตกลง หน้าต่างใหม่ที่ปรากฏขึ้นจะแจ้งให้ผู้ใช้ยกตุ้มน้ำหนักลงบนคานวัด จากนั้นตอบตกลงเมื่อหน้าจอปรากฏข้อความ Calibration successful ตอบตกลงแล้วเอาตุ้มน้ำหนักลง

    7.2 Probe calibration (การทำขั้นตอนนี้เพื่อหลีกเลี่ยงความเผลอเรอที่เกิดจากการใช้หัววัดที่แตกต่างไปจากหัววัดก่อนหน้านี้)

เลือก T.A. –Calibrate probe กำหนดระยะทางให้มีความสูงกว่าชิ้นตัวอย่างเล็กน้อย สวมหัววัด จากนั้นตอบตกลง หัววัดจะเคลื่อนที่ลงมาแตะกับฐานแล้วกลับไปยังตำแหน่งที่กำหนดซึ่ง Texture expert จะอ่านตำแหน่งดังกล่าวเป็นศูนย์

8. เลือก T.A.-setting จากแถบคำสั่ง T.A. เพื่อกำหนดค่าปัจจัยต่างๆ ซึ่งค่าเหล่านี้ได้มาจากเอกสารอ้างอิงของผู้ใช้ หรือดูจากเอกสารแนะนำจากบริษัทผู้ผลิตเครื่องเมื่อกำหนดค่า แล้วคลิกที่ update
9. เลือก run a test เพื่อทำการวัดตัวอย่าง หลังจากวางตัวอย่างบนฐานวัดเรียบร้อยแล้วทำการตั้งชื่อ file directory : text_exp เพื่อบันทึกข้อมูล จากนั้นตอบตกลงหัววัดจะเลื่อนลงมาเพื่อวัดตัวอย่าง
10. ข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูปกราฟ การหาค่าจากกราฟที่ได้ สามารถทำได้โดยการใช้คำสั่งใน Process data
11. การกำหนดค่าใน Process data หรือการเขียน Macro ซึ่งจะใช้ในการหาค่าจากกราฟออกมาเป็นตัวเลข
    - 11.1 เลือกแถบคำสั่ง Process data หรือการเขียน Macro เลือก edit
    - 11.2 เลือกคำสั่งย่อยที่ต้องการ จากคำสั่งต่างๆ ที่แสดง
    - 11.3 บันทึกแฟ้มไว้เพื่อเรียกใช้งาน
12. เมื่อหาข้อมูลจากกราฟได้แล้ว ผลที่ได้จะอยู่ในภาพตารางข้อมูล สามารถพิมพ์โดยใช้คำสั่ง file ได้

ภาพประกอบภาคผนวกที่ 2 กราฟแสดงการวัดเนื้อสัมผัส โดย Texture Profile Analysis

ที่มา : Bourne (1978)

Hardness	หมายถึง	แรงสูงสุดที่ใช้ในการกดครั้งแรก
Cohesiveness	หมายถึง	อัตราส่วนของแรงระหว่างการกดครั้งที่ 2 จากจุดเดิมที่กดครั้งแรก
Adhesiveness	หมายถึง	พื้นที่แรงที่ต้านการกดของแรงสูงสุดที่ใช้ในการกดครั้งแรก
Springiness	หมายถึง	ส่วนสูงที่ตัวอย่างสามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ระหว่าง

เวลาที่สิ้นสุดการกดครั้งแรกและเริ่มการกดครั้งใหม่

Gumminess หมายถึง Hardness × Cohesiveness

Chewiness หมายถึง Gumminess × Springiness หรือ

Hardness × Cohesiveness × Springiness

9. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลพอกซิจิเนส Ben-Aziz และคณะ (1970 อ้างโดย Tangwongchai *et al*., 2000)

<u>สารเคมี</u>

สารตั้งต้น (Substrate stock solution) : นำสารละลายกรดลิโนเลอิกในสารละลายเอทานอลอิ่มตัวความเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนักโดยปริมาตร ปริมาณ 7.1 มิลลิลิตร ผสมกับ tween 20 ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ระเหยเอาเอทานอลออกโดยเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน เจือจางสารละลายที่เหลือด้วยสารละลาย Na_2HPO_4 เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาณ 100 มิลลิลิตร แล้วปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้เท่ากับ 9.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ สารตั้งต้นที่ได้เป็นสารละลายใสประกอบด้วยสารละลายกรดลิโนเลอิกและ tween 20 ความเข้มข้นเท่ากับ 2.5×10^{-3} โมลาร์ และ ร้อยละ 0.2 ตามลำดับ ในขั้นตอนวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลพอกซิจิเนส สารตั้งต้นจะถูกเจือจางลงเท่ากับ 4×10^{-5} โมลาร์ ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 9.0

<u>วิธีการ</u>

1. ใส่สารตั้งต้น 2.4 มิลลิลิตร ลงใน quartz cuvette เริ่มนับเวลาที่ 0 วินาที
2. ปิเปตสารสกัดเอนไซม์ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ลงใน cuvette กลับ cuvette ขึ้นลงทันที แล้วเริ่มบันทึก
3. ช่วงเวลาตั้งแต่เติมสารสกัดเอนไซม์จนกระทั่งเริ่มบันทึกไม่ควรเกิน 10 วินาที
4. การเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงจะถูกบันทึกไว้ทุกๆ 30 วินาที
5. สำหรับ blank ทำเหมือนข้อ 1-2 แต่เปลี่ยนจากสารสกัดเอนไซม์เป็นน้ำกลั่นแทน
6. การ auto zero ใช้ blank

<u>การคำนวณ</u>

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ไลพอกซิจิเนส (unit/ml.)} = \frac{(\Delta A_{234nm} / \Delta \text{time})*10}{(0.001)}$$

โดยที่ ΔA_{234nm} = การเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสง

Δtime = การเปลี่ยนแปลงของเวลา

$\Delta A_{234nm} / \Delta$time = ค่าความชันของค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 นาโนเมตร

0.001= การเปลี่ยนแปลงของ ΔA_{234nm} / min. ต่อ unit ของเอนไซม์ไลพอกซิจิเนส ค่าความเป็นกรดด่าง 9 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อกรดลิโนเลอิกเป็นสารตั้งต้นใน reaction volume 2.5 มิลลิลิตร (ต่อนิยามของคำว่าหน่วย) โดย 1 หน่วย (unit) หมายถึงการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร จำนวน 0.001 ต่อนาทีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 9.0 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อกรดลิโนเลอิกเป็นสารตั้งต้นในสารละลายปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร

10. วิธีสกัดเอนไซม์ไลพอกซิจิเนสจากเต้าหู้อ่อน (ดัดแปลงจาก Suda *et al*., 1995)

<u>วิธีการ</u>

นำตัวอย่าง 1 กรัม เติมน้ำกลั่นเย็นปริมาณ 9 มิลลิลิตร บดให้ละเอียดด้วยโฮโมจีไนเซอร์ความเร็วระดับ 1 นาน 1 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หมุนเหวี่ยงสารแขวนลอยด้วยความเร็ว 10000×g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ของเหลวที่ได้นำมาใช้วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลพอกซิจิเนสภายใน 2-3 ชั่วโมง

11. การวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ทั้งหมดสำหรับจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (psychrophilic) (ดัดแปลงจาก Hansen *et al*., 1995)

<u>วิธีการเตรียมตัวอย่าง</u>

นำตัวอย่าง 20 กรัม สารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.9 (น้ำหนักโดยปริมาตร) เละ peptone water ร้อยละ 0.1 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาณ 180 มิลลิลิตร ใส่ลงในถุงพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นตีผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องตีปั่นไฟฟ้านาน 60 วินาที เจือจางสารแขวนลอยตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-2} และ 10^{-3}

<u>วิธีการวิเคราะห์จุลินทรีย์</u>

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 2 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น
2. เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA 10-15 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจากนั้น หมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อตามเข็มนาฬิกา 5 ครั้ง ทวนเข็มนาฬิกา 5 ครั้ง ไปข้างหน้าและข้างหลัง ควรระวังไม่ให้อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดการปนเปื้อน ทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว
3. บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน
4. นับจำนวนจุลินทรีย์ในช่วง 30-300 โคโลนี ตรงบริเวณผิวและในเนื้อวุ้น

<u>การคำนวณ</u>

aerobic plate count (APC) = x.d/s colony forming unit (cfu)/g

โดยที่ d = ความเข้มข้นของสารละลาย

x = จำนวนโคโลนีเฉลี่ย

s = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใส่ลงในแต่ละจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตัวอย่างการคำนวณ

ความเข้มข้น	จำนวนจุลินทรีย์เฉลี่ยจากเพลท 2 ซ้ำ	การคำนวณ
10^{-2}	2,854*	*ไม่สามารถนับได้
10^{-3}	291	(291000+360000)/2 = 3.3×10^5/g
10^{-4}	36	
10^{-5}	4*	*ไม่สามารถนับได้

13. ตรวจสอบการละลายของโปรตีนด้วยสารละลายต่าง ๆ (ดัดแปลงจาก Roussel and Cheftel, 1990)

นำตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ลงในสารละลายปริมาตร 9 มิลลิลิตร ดังต่อไปนี้

S1 = สารละลายทริส-ไฮโดรคลอริก บัฟเฟอร์ 30 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0

S2 = S1 + สารละลายยูเรีย 8 โมลาร์

S3 = S1 + สารละลายเบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล 0.2 โมลาร์

สารละลายโซเดียมไอดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์

กวนที่อุณหภูมิห้องนาน 20 ชั่วโมง นำสารแขวนลอยที่ได้มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm. นาน 15 นาที นำส่วนใสที่ได้ ปริมาณ 3 มิลลิลิตรมาเติมกรดไตรคลอโรอะซิติกเย็น (trichloroacetic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาณ 0.9 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm. นาน 5 นาที แล้วแยกเอาส่วนใสทิ้ง เติมกรดไตรคลอโรอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาณ 2 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทำละลายตะกอนที่ได้ ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้จนกว่าตะกอนจะละลายหมด นำสารละลายที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีไบยูเรทปรียบเทียบเต้าหู้อ่อนทางการค้า

14. วิธีการวัดค่าสีด้วยเครื่องวัดค่าสี (CIE Lab)

นำตัวอย่างมาตั้งทิ้งไว้ เพื่อให้อุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องประมาณ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นทำให้ละเอียดด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ความเร็วระดับ 1 นาน 2 นาที เพื่อให้ตัวอย่างอยู่ในรูปของไหลเหมือนๆ กัน เทตัวอย่างที่ได้ใส่ในถ้วยแก้วรูปทรงกระบอกขนาด 50 มิลลิลิตร จนเต็มแล้วปิดด้วยแผ่นสแตนเลสวงกลมสีขาว นำถ้วยแก้วรูปทรงกระบอกไปวางบนช่องสำหรับวัดค่าสีของเครื่องให้พอดีกัน ทำการวัดค่าสีออกมาในค่าของ L*, a*, และ b* (CIE Lab system) วัดค่าสีของสามตัวอย่างหรือมากกว่า บันทึกแล้วหาค่าเฉลี่ย

15. วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจสอบโครงสร้างทางจุลภาคโดยวิธี Scanning Electron Microscope (SEM) (ดัดแปลงจาก Verheul และ Roefs, 1998)

ตัดตัวอย่างขนาด กว้างxยาวxหนา เท่ากับ 0.5x0.5x0.1 เซนติเมตร ใส่ในสารละลายกลูทาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ในน้ำกลั่น ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ปริมาตรโดยปริมาตร นาน 1 ชั่วโมง ล้างตัวอย่างออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ดึงน้ำออก (dehydration) โดยแช่ในสารละลายเอทานอล ความเข้มข้นต่างๆดังนี้ ร้อยละ 10-30-50-70-90-100-100-100 ปริมาตร

โดยปริมาตร นาน 20 นาทีต่อขั้นตอน สุดท้ายแช่ในสารละลายเอทานอลร้อยละ 100 ข้ามคืน แล้วจึงส่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางจุลภาพต่อไป

ภาคผนวก ข

ข1. แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสแบบ Maltisample Difference test สำหรับประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์เต้าหู้อ่อน

ชื่อ……..…วันที่……..……..เวลา……

คำชี้แจง โปรดทำการทดสอบคุณสมบัติด้านต่างๆ ของผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง แล้วทำเครื่องหมายเส้นตรงตามขวางตั้งฉากกับสเกลแนวนอนที่ให้ไว้ เพื่อแสดงตำแหน่งที่ท่านได้ให้ไว้กับตัวอย่างในลักษณะนั้นๆ ตามที่ท่านเห็นว่าเหมาะสมที่สุดในการเป็นตัวแทนลักษณะนั้นๆ ของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง พร้อมทั้งเขียนรหัสของตัวอย่างบนเครื่องหมายเส้นตรง

โปรดทดสอบตัวอย่างเรียงตามลำดับต่อไปนี้

คุณลักษณะด้านประสาทสัมผัส

1. กลิ่นรสถั่วเหลือง (เหม็นเขียว)

ไม่มีกลิ่นรส มีกลิ่นรสเล็กน้อย มีกลิ่นรสปานกลาง มีกลิ่นรสมาก

2. รสขม

ไม่มี มีเล็กน้อย มีปานกลาง มีมาก

3. ความฝาด

ไม่มี มีเล็กน้อย มีปานกลาง มีมาก

4. ความหยาบ

ไม่หยาบ หยาบเล็กน้อย หยาบปานกลาง หยาบมาก

*** ขอบคุณ ***

ข2. แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสแบบ Maltisample Difference test สำหรับประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์เต้าหู้อ่อนในระหว่างการเก็บรักษานาน 15 วัน

ชื่อ……วันที่……..เวลา……..……

คำชี้แจง โปรดทำการทดสอบคุณสมบัติด้านต่างๆ ของผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง แล้วทำเครื่องหมายเส้นตรงตามขวางตั้งฉากกับสเกลแนวนอนที่ให้ไว้ เพื่อแสดงตำแหน่งที่ท่านได้ให้ไว้กับตัวอย่างในลักษณะนั้นๆ ตามที่ท่านเห็นว่าเหมาะสมที่สุดในการเป็นตัวแทนลักษณะนั้นๆ ของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง พร้อมทั้งเขียนรหัสของตัวอย่างบนเครื่องหมายเส้นตรง

โปรดทดสอบตัวอย่างเรียงตามลำดับต่อไปนี้

คุณลักษณะด้านประสาทสัมผัส

1. กลิ่นรสผิดปกติ

ไม่มีกลิ่นรส มีกลิ่นรสเล็กน้อย มีกลิ่นรสปานกลาง มีกลิ่นรสมาก

2. เนื้อสัมผัส

ไม่แข็ง แข็งเล็กน้อย แข็งปานกลาง แข็งมาก

*** ขอบคุณ ***

ข3. แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสแบบ Hedonic scale สำหรับประเมินคุณภาพทางระสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์เต้าหู้อ่อนในระหว่างการเก็บรักษานาน 15 วัน

ชื่อ……วันที่……..……เวลา…….……..

คำแนะนำ กรุณาทดสอบตัวอย่างที่เสนอให้จากซ้ายไปขวา แล้วให้คะแนนความชอบตัวอย่างในแต่ละปัจจัยที่ใกล้เคียงกับความรู้สึกของท่านมากที่สุด และกรุณาบ้วนปากระหว่างตัวอย่างโดยกำหนดให้

9=ยอมรับมากที่สุด
8=ยอมรับมาก
7=ยอมรับปานกลาง
6=ยอมรับน้อย
5=เฉยๆ
4=ไม่ยอมรับเล็กน้อย
3=ไม่ยอมรับปานกลาง
2=ไม่ยอมรับมาก
1=ไม่ยอมรับมาก

ปัจจัย	คะแนนการยอมรับ				
รหัส	_____	_____	_____	_____	_____
ลักษณะปรากฏ	_____	_____	_____	_____	_____
กลิ่นรส	_____	_____	_____	_____	_____
เนื้อสัมผัส	_____	_____	_____	_____	_____
ความชอบรวม	_____	_____	_____	_____	_____

*** ขอบคุณ ***