ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ก.1 การวิเคราะห์ความชื้น (AOAC, 1990)

อุปกรณ์

1. ตู้อบไฟฟ้า
2. ภาชนะหาความชื้น (จานอลูมิเนียม พร้อมฝา)
3. โถดูดความชื้น
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า

วิธีการ

1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

2. กระทำเช่นข้อ 1 ซ้ำ จนได้ผลแตกต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3. ชั่งตัวอย่างที่ต้องการหาความชื้นให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1-3 มิลลิกรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้น ซึ่งทราบน้ำหนักแล้ว นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมตัวอย่างนั้น จากนั้นนำกลับไปเข้าตู้อบอีก และกระทำซ้ำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

ก2. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC, 1990)

อุปกรณ์

1. เตาเผา (muffle furnace)
2. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (porcelain crucible)
3. โถดูดความชื้น
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ปิดสวิทซ์เตาเผาแล้วรอประมาณ 30-45 ชั่วโมง เพื่อให้อุณหภูมิภายในเตาเผาลดลงก่อน แล้วนำออกจากเตาเผาใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

2. เผาซ้ำอีกครั้งครั้งละประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้ง 2 ครั้ง ติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว นำไปเผาในตู้ดูดควันจนหมดควัน แล้วจึงนำเข้าเตาเผาอุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส และกระทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 1-2

การคำนวณ

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

ก3. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC, 1990)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (soxhlet apparatus) ประกอบด้วยขวดกลม สำหรับใส่ตัวทำละลาย ซอคเลต (soxhlet) เครื่องควบแน่น (condenser) และเตาให้ความร้อน (heating mantle)
2. หลอดใส่ตัวอย่าง (extraction thimble)
3. สำลี
4. ตู้อบไฟฟ้า
5. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
6. โถดูดความชื้น

วิธีการ

1. อบขวดกลมสำหรับหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้าทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก ประมาณ 1-2 มิลลิกรัม ห่อให้มิดชิดแล้วใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยสำลีเพื่อให้สารทำละลายมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ
3. นำหลอดตัวอย่างใส่ลงในซอคเลต
4. เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ ลงในขวดหาไขมันปริมาณ 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตาให้ความร้อน
5. ทำการสกัดไขมันเป็นเวลา 14 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่น ด้วยอัตรา 150 หยดต่อนาที
6. เมื่อครบ 14 ชั่วโมง นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอคเลต และกลั่นกับสารทำละลายจนเหลือสารละลายในขวดกลมเพียงเล็กน้อยด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลาย
7. นำขวดหาไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส จนแห้ง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

8. ชั่งน้ำหนัก แล้วอบซ้ำครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนัก 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

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

ก4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (AOAC, 1990)

อุปกรณ์

1. ขวดย่อยโปรตีน (Kjeldahl flask) ขนาด 250-300 มิลลิลิตร
2. ชุดกลั่นโปรตีน
3. ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร
4. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 50 มิลลิลิตร
5. ปิเปต ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
6. บิวเรต ขนาด 25 มิลลิลิตร
7. ลูกแก้ว
8. กระดาษกรอง

สารเคมี

1. กรดซัลฟุริกเข้มข้น
2. สารเร่งปฏิกริยา ใช้คอปเปอร์ซัลเฟต (Cu_2SO_4) 1 ส่วนต่อโปแตสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 9 ส่วน
3. สารประกอบของโซเดียมไฮดรอกไซด์ และโซเดียมไธโอซัลเฟต เข้มข้นร้อยละ 60 โดยชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ 60 กรัม และสารละลายโซเดียมไธโอ-ซัลเฟต 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายกรดบอริก (H_3BO_3) เข้มข้นร้อยละ 4 ละลายกรดบอริก 40 กรัม ด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

5. สารละลายกรดเกลือ เข้มข้น 0.02 นอร์มอล

6. อินดิเคเตอร์ ใช้ fashiro indicator เตรียมเป็น stock solution (ชั่งเมทธิลีนบูล (Methylene blue) 0.2 กรัม ละลายในเอทธานอล (ethanol) 200 มิลลิลิตร และชั่งเมทธิลเรด (Methyl red) 0.05 กรัม ละลายในเอทธานอล 50 มิลลิลิตร) เวลาใช้นำมาผสมในอัตราส่วน Stock solution 1 ส่วน ต่อ เอทธานอล 1 ส่วน ต่อน้ำกลั่น 2 ส่วน

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างอาหารบนกระดาษกรองให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 1-2 กรัม ห่อให้มิดชิดใส่ลงในขวดย่อยโปรตีน

2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา 5 กรัม และกรดซัลฟุริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร

3. ใส่ลูกแก้ว 2 เม็ด นำไปย่อยบนเตาไฟในตู้ควันจนกระทั่งได้สารละลายใส ปล่อยทิ้งให้เย็น

4. เติมน้ำกลั่นร้อนลงไปล้างบริเวณคอขวดให้ทั่ว และให้ความร้อนต่อไปจนหมดควันของกรดซัลฟุริก ปล่อยทิ้งให้เย็น

5. นำมาถ่ายลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นล้างขวดย่อยโปรตีนให้หมดสารละลายตัวอย่าง แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

6. จัดอุปกรณ์กลั่น

7. นำขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมกรดบอร์ริกเข้มข้นร้อยละ 4 ลงไป 5 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และเติมอินดิเคเตอร์ เรียบร้อยแล้วไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลายกรดนี้

8. ดูดสารละลายตัวอย่างด้วยปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในช่องใส่ตัวอย่าง แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป 20 มิลลิลิตร

9. กลั่นประมาณ 10 นาที ล้างปลายอุปกรณ์ควบแน่นด้วยน้ำกลั่นลงในขวดรองรับ

10. ไตเตรทสารละลายที่กลั่นได้กับสารละลายกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.02 นอร์มอล จะได้จุดยุติเป็นสีม่วง

11. ทำ blank ด้วยวิธีการเดียวกันตั้งแต่ข้อ 2-10

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{(a-b) \times N \times 14 \times \text{Factor}}{W}$$

โดยที่ a = ปริมาณของสารละลายกรดเกลือที่ใช้เป็นมิลลิลิตร

b = ปริมาณของสารละลายกรดเกลือที่ใช้กับ blank เป็นมิลลิลิตร

N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือเป็นนอร์มาล

W = น้ำหนักตัวอย่างเป็นกรัม

14.07 = น้ำหนักสมมูลย์ของไนโตรเจน

Factor = 6.25

ก5. การวัดพีเอช (Benjakul *et al.*, 1997)

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดพีเอช
2. บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร
3. กระบอกตวงขนาด 50 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ในภาชนะบรรจุ 50 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร โฮโมจิไนส์ เป็นเวลา 2 นาที
2. วัดค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช

ภาคผนวก ข. การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพ

ข1. การวิเคราะห์หาปริมาณด่างที่ระเหยได้ (TVB-N) และไตรเมทิลเอมิน (TMA-N) โดยวิธี Conway unit (Ng, 1987)

อุปกรณ์

1. จานคอนเวย์
2. Volumetric pipette
3. Microburette
4. เครื่องโฮโมจิไนส์
5. กระดาษกรอง
6. กรวยกรอง
7. ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. Mixed indicator : ละลาย 0.01 กรัมของ Bromocresol green และ 0.02 กรัม Methyl red ด้วย ethanol แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร
2. Inner ring solution : ละลาย 10 กรัม Boric acid ใน 200 มิลลิลิตร ethanol แล้วเติม 10 มิลลิลิตร mixed indicator (จากข้อ 1) ปรับปริมาตรจนได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น
3. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.02 นอร์มอล
4. สารละลาย K_2CO_3 อิ่มตัว : ละลาย 60 กรัม K_2CO_3 ด้วย 50 มิลลิลิตร น้ำกลั่นต้มนาน 10 นาที ทำให้เย็นแล้วกรองผ่านกระดาษกรอง
5. สารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้นร้อยละ 4 : ละลาย 40 กรัม ของกรดไตรคลอโรอะซีติก (CCl_3COOH) ในน้ำกลั่น 960 มิลลิลิตร
6. สารละลายฟอร์มาลดิไฮด์ร้อยละ 10 : เติม 10 กรัม $MgCO_3$ ลงใน 100 มิลลิลิตร Formalin (สารละลายฟอร์มาลดิไฮด์ร้อยละ 35) เขย่าให้เข้ากันแล้วกรองผ่านกระดาษกรองทำให้เจือจาง 3 เท่าด้วยน้ำกลั่น
7. วาสลีน

การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาณ 8 มิลลิลิตร โฮโมจิไนส์ให้ละเอียด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษเบอร์ 41 ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร (เก็บตัวอย่างในน้ำแข็งขณะใช้)

การหาค่า (TVB-N)

1. ทาวาสลีนที่ขอบฝาจานคอนเวย์
2. ดูดสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงในวงกลมชั้นนอกของจานคอนเวย์
3. ดูด Inner ring solution 1 มิลลิลิตร ลงในวงกลมชั้นในของจานคอนเวย์
4. ดูดสารละลาย K_2CO_3 อิ่มตัว 1 มิลลิลิตร ใส่ชั้นนอก แต่ให้อยู่คนละด้านกับสารละลายตัวอย่างที่ใส่ในข้อ 2
5. ปิดฝาจานคอนเวย์ให้สนิท
6. เอียงหรือหมุนจานคอนเวย์เบาๆ ให้ K_2CO_3 ผสมกับสารละลายตัวอย่าง ระวังอย่าให้เกิดการผสมกับ Indicator ที่วงกลมชั้นในเป็นอันขาด
7. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 45-60 นาที หรือทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง
8. เปิดฝาจานคอนเวย์แล้วไตเตรท ที่วงกลมชั้นในด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.02 นอร์มอล จนกระทั่งสีเขียวจางหายไป จดปริมาตรกรดไว้คำนวณ
9. ทำ Blank โดยใช้สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 4 จำนวน 1 มิลลิลิตร แทนตัวอย่าง

การคำนวณ TVB-N

$$\text{TVB-N (มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัมตัวอย่าง)} = \frac{(N)(14)(A-B)(V)(100)}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

เมื่อ N คือ Normality ของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรท

A คือ มิลลิลิตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

B คือ มิลลิลิตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรท Blank

V คือ ปริมาตรรวมของตัวอย่างและสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

การหาค่า TMA-N

1. ทำเช่นเดียวกับการหา TVB ข้อ 1-3
2. เติม สารละลายฟอร์มาลดิไฮด์ร้อยละ 10 จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมกับตัวอย่าง
3. ปิดฝาทันที แล้วค่อยๆ เอียงหรือหมุนเบาๆ ให้สารละลายชั้นนอกผสมกัน
4. ดูดสารละลาย K_2CO_3 อิ่มตัว 1 มิลลิลิตร ใส่ชั้นนอกปิดฝาแล้วค่อยๆ หมุน
5. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง
6. ไตเตรทที่วงชั้นในด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.02 นอร์มอล จนกระทั่งสีเขียวเปลี่ยนเป็นสีชมพู จดปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกไว้คำนวณ
7. ทำ Blank โดยใช้สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 4 จำนวน 1 มิลลิลิตร ทำเช่นเดียวกับตัวอย่าง

การคำนวณหา TMA-N

$$\text{TMA-N (มิลลิกรัมไนโตรเจน/ 100 กรัม)} = \frac{(N)(14)(C-B)(V)(100)}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

เมื่อ N คือ Normality ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรท

C คือ มิลลิลิตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

B คือ มิลลิลิตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรท Blank

V คือ ปริมาตรรวมของตัวอย่างและสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

ข2. เกณฑ์การวิเคราะห์ลักษณะของปลาที่มีคุณภาพแตกต่างกัน (EEC, 1976)

Part of Fish Inspected	Criteria Marks 3	2	1	0
	Appearance			
Skin	Bright, iridescent Pigmentation, no Discoloration	Pigmentation bright but not lustrous	pigmentation in the process of becoming Discoloured an dull	[1]Dull
	Aqueous, Transparent mucus	slightly cloudy mucus	Milky mucus	Opaque mucus
Eye	Convex (bulging)	Convex and Slightly sunken	Flat	[1]Concave in the center
	Transparent Cornea	Slightly opalescent cornea	Opalescent cornea	Milky cornea
	Black, bright pupil	Black, dull pupil	Opaque pupil	Grey pupil
Gill	Bright colour No mucus	Less coloured Slight traces of Clear mucus	Becoming discoloured Opaque mucus	[1]Yellowish Milky mucus
Flesh (Cut from abdo-men	Bluish, translucent smooth, shining No change in original colour	Velvety, waxy, dull Colour slightly changed	Slightly opaque	[1]Opaque

Criteria				
Part of Fish Inspected	Marks			
	3	2	1	0
Colour (along vertebral Column)	Uncoloured	Slightly pink	Pink	[1]Red
Organs	Kidneys and Residues of other organs should be bright red, as should the blood inside the aorta	Kidneys and residues of other organs should be dull red; blood becoming discoloured	Kidneys, residues of other organs and blood should be pale red	[1]Kidneys, residues of other organs and blood should be brownish in colour
	Condition			
Flesh	Firm and elastic Smooth surface	less elastic	Slightly soft (flaccid), less elastic Waxy (velvety) and dull surface	[1]Soft (flaccid) easily detached from skin, surface wrinkled, inclining to mealy

Criteria				
Part of Fish	Marks			
Inspected	3	2	1	0
Vertibral Column	Breaks instead of Coming away	Sticks	Sticks slightly	[1]Does not stick
Peritoneum	Sticks completely to coming away	Sticks	Sticks slightly	[1]Does not stick
		Smell		
Gills, Skin Abdominal cavity	Seaweed	No smell of seaweed or and bad smell	Slightly sour	[1]Sour

[1] or in amore advanced state of decay

ที่มา : EEC (1976)

ภาคผนวก ค. การวิเคราะห์โปรตีน

ค1. การสกัดแอกโตไมโอซิน (Benjakul *et al.*, 1997)

สารเคมี

1. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ พีเอช 7.0
2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ พีเอช 7.0

วิธีการ

1. นำเนื้อปลา 7 กรัม มาเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ พีเอช 7.0 (4 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 70 มิลลิลิตร
2. โฮโมจิไนส์นาน 4 นาที และเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 5,000 × g นาน 30 นาที (4 องศาเซลเซียส)
3. ตะกอนที่ได้เติมน้ำกลั่น (0 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 3 เท่า และเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 5,000 × g นาน 20 นาที (4 องศาเซลเซียส)
4. ตะกอนที่ได้เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 1 เท่า ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 5,000 × g นาน 20 นาที (4 องศาเซลเซียส)
5. ตะกอนที่ได้ใช้เป็นแหล่งของแอกโตไมโอซิน

ค2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเรท (Copeland, 1994)

อุปกรณ์

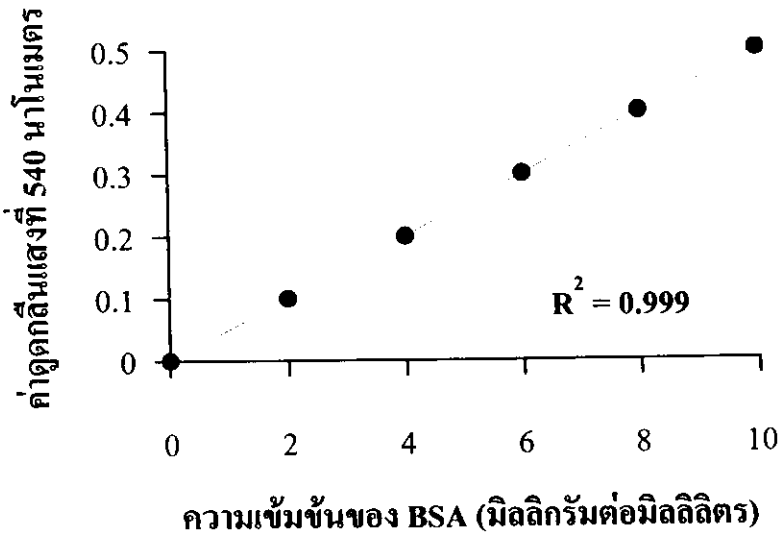
1. หลอดทดลอง
2. นาฬิกาจับเวลา
3. Vertex mixer
4. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

สารเคมี

1. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. สารละลายไบยูเรท : ชั่ง $CuSO_4.5H_2O$ 1.5 กรัม โซเดียมโพแตสเซียมทาเตรท 6.0 กรัม เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร กวนจนเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 10 จำนวน 300 มิลลิลิตร ในขณะกวน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ดูดสารละลายแอกโตไมโอซิน 50 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น 450 ไมโครลิตร (สารละลายโปรตีน 500 ไมโครลิตร) ใส่หลอดทดลอง
2. เติมสารละลายไบยูเรท 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vertex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA ดังรูปผนวกที่ 1 ปริมาณโปรตีนคำนวณโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หารด้วยค่าความชันที่ได้จากกราฟมาตรฐาน BSA



รูปผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีน โดยใช้ Bovine Serum Albumin เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA)

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

ภาคผนวก ง. การทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซีสตามวิธีของ Laemmli (1970)

อุปกรณ์

1. ชุดอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบมินิเจล
2. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
3. Vertex
4. นาฬิกาจับเวลา
5. หลอดทดลอง

สารเคมี

1. Acrylamide/bisacrylamide เตรียมโดยละลาย Acrylamide 29.2 กรัม และ bisacrylamide 0.8 กรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้ประมาณ 1 เดือน หลังจากการเตรียม
2. สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8
3. สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8
4. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 10 (เก็บที่อุณหภูมิห้อง)
5. Sample buffer (Sodium dodecyl sulfate reducing buffer)

น้ำกลั่น	3.8 มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl , pH 6.8	1.0 มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	0.8 มิลลิลิตร
10% Sodium dodecyl sulfate	1.6 มิลลิลิตร
เบตา-เมอแคปโตเอธานอล	0.4 มิลลิลิตร
1% โบรโมฟีนอลบลู	0.4 มิลลิลิตร

6. 5x electrode (running) buffer, pH 8.3

Tris-HCl	9 กรัม
ไกลซีน	43.2 กรัม
Sodium dodecyl sulfate	3 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

7. Catalyst ประกอบด้วย

2% Ammonium persulfate เตรียมก่อนที่จะใช้

TEMED (N,N,N, N-tetramethyl ethylenedismine)

8. โปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล High Molecular Weight (Sigma) ประกอบด้วย myosin. B-Galactosidade, phosphorylase b, fructose-6-phosphate kinase, albumin, glutamic dehydrogenase, ovalbumin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase มีน้ำหนักโมเลกุล 250,000 116,000 67,000 84,000 66,000 55,000 45,000 36,000 ดาลตัน ตามลำดับ

9. สีย้อมโปรตีน Coomassie Brilliant Blue R-250

10. Staining solution : ละลาย Coomassie Brilliant Blue R-250 0.04 กรัม ในเมธานอล 100 มิลลิลิตร กวนจนละลายหมด แล้วเติม Glacial Acetic acid 15 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 85 มิลลิลิตร

11. Destaining Solution

Destaining Solution 1 : ผสมเมธานอล 200 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 30 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 170 มิลลิลิตร

Destaining Solution 2 : ผสมเมธานอล 50 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 75 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 875 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่าง

นำสารละลายแอกโตไมโอซินจากการสกัดแอกโตไมโอซินในภาคผนวก ค.1 ปรับความเข้มข้นของโปรตีนให้ทุกตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำมาผสมกับ Sample buffer (อัตราส่วน 1:1) ต้มสารผสมเป็นเวลา 4 นาที

2. การเตรียม running gel

สารเคมี	10% gel
30% Acrylamide/bis	1.167 ml

1.5 M Tris-HCl buffer pH 8.8	0.875 ml
1% Sodium dodecyl sulfate	0.35 ml
TEMED	5 µl

3. การเตรียม stacking gel

30% Acrylamide/bis	0.4 ml
0.5 M Tris-HCl buffer pH 6.8	1.0 ml
1% Sodium dodecyl sulfate	0.3 ml
น้ำกลั่น	1.1 ml
0.1 M EDTA	0.8 ml
2% Ammonium persulfate	0.4 ml
TEMED	6 µl

4. การแยกโปรตีนโดยเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส

ประกอบชุดเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส จากนั้นเติม electrode buffer ให้เต็ม chamber จากนั้น load ตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 1 จำนวน 10 ไมโครลิตร (มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 30 ไมโครกรัม) ต่อชุดอิเล็กโตรโฟรีซีสเข้ากับ power supply เปิดกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ จนสีของโบรโมฟีนอลบลู เคลื่อนถึง running gel (ประมาณ 30 นาที) เปลี่ยนกระแสไฟฟ้าเป็น 150 โวลต์ จนสีของโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนจนเกือบสุดปลายกระจก จึงหยุดการให้กระแสไฟฟ้า

5. การย้อมสีโปรตีนในเจล โดยย้อมใน staining solution 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแช่ด้วย Destaining solution 1 เป็นเวลา 30 นาที แล้วแช่ใน Destaining solution 2 จนกระทั่งเจลใสและสังเกตเห็นแถบโปรตีนได้ชัดเจน

ภาคผนวก จ. การวิเคราะห์หาปริมาณ Sulfhydryl ของโปรตีนแอกโตไมโอซิน (Sompongse *et al.*, 1996a)

อุปกรณ์

1. ไมโครปิเปต
2. หลอดทดลอง
3. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
4. นาฬิกาจับเวลา
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ

สารเคมี

1. สารละลาย Tris-HCl buffer เข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 6.8
2. สารละลาย 5,5′ -dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) เข้มข้นร้อยละ 0.1
3. สารละลาย KCl เข้มข้น 0.6 โมลาร์ พีเอช 7.0

วิธีการ

1. นำสารละลายแอกโตไมโอซินมา 1 มิลลิลิตร (โดยให้มีความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เติม Tris-HCl buffer เข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 6.8 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vertex

2. ดูดสารละลายที่ได้จากข้อ 1. มา 4 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 5,5′ -dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) เข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร

3. นำสารละลายจากข้อ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร

4. ทำ Blank โดยใช้สารละลาย KCl เข้มข้น 0.6 โมลาร์ พีเอช 7.0 แทนตัวอย่างด้วยวิธีการเดียวกันตั้งแต่ข้อ 1-3

5. คำนวณปริมาณ Sulfhydryl จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 นาโนเมตร

การคำนวณ

$$C = \frac{A}{\Sigma}$$

เมื่อ C คือ ปริมาณ Sulhydryl

A คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 นาโนเมตร

Σ คือ ค่าคงที่ (molar extinction) 13,600 M^{-1} cm^{-1}

ภาคผนวก ฉ. การวิเคราะห์ค่า Hydrophobicity ของโปรตีนแอกโตไมโอซิน

(Benjakul *et al.*, 1997)

อุปกรณ์

1. ไมโครปิเปต
2. หลอดทดลอง
3. เครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์
4. นาฬิกาจับเวลา
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ

สารเคมี

1. สารละลาย Phosphate buffer เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0
2. สารละลาย 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid (ANS) เข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์
3. สารละลาย Phosphate buffer เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0

วิธีการ

1. ทำการเจือจางสารสกัดแอกโตไมโอซินด้วยสารละลาย Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0 ให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 4 ระดับ คือ 1.25 2.5 5.0 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยให้มีปริมาตรสุดท้ายหลอดละ 4 มิลลิลิตร

2. นำสารละลายบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติมสารละลาย ANS ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ ในสารละลาย Phosphate buffer เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น Excitation 374 นาโนเมตร และความยาวคลื่น Emission 485 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์

4. คำนวณค่า Hydrophobicity โดยหาค่าความชันจากค่า So ต่อปริมาณร้อยละความเข้มข้นของโปรตีน

ภาคผนวก ช. การวิเคราะห์ค่า Emulsion capacity ของเนื้อปลาและโปรตีนแอกโตไมโอซิน (Swift *et al.*, 1961)

อุปกรณ์

1. เครื่องโฮโมจิไนส์
2. กระบอกตวง
3. บีกเกอร์

สารเคมี

1. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (เก็บที่อุณหภูมิ 0-5 องศาเซลเซียส)
2. น้ำมันถั่วเหลือง

วิธีการ

1. นำเนื้อปลาจำนวน 25 กรัม หรือแอกโตไมโอซินที่สกัดได้ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวกค.1) จำนวน 25 กรัม เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร โฮโมจิไนส์ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

2. แบ่งสารละลายจากข้อ 1 มา 12.5 กรัม เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 37.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาที เติมน้ำมันถั่วเหลือง 50 มิลลิลิตร

3. เติมน้ำมันถั่วเหลืองในอัตรา 0.8 มิลลิลิตรต่อวินาที พร้อมโฮโมจิไนส์ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที

4. สังเกตการยุบตัวและการลดลงของความหนืดของอิมัลชั่น

5. บันทึกปริมาตรน้ำมันที่ใช้เติมทั้งหมด

ภาคผนวก ซ. การตรวจสอบคุณภาพของไส้กรอกปลาอิมัลชั่น

ซ1. การวัดเนื้อสัมผัสโดยใช้เครื่อง TA-XT2 Texture Analyzer (Bourne, 1978)

อุปกรณ์

1. เครื่อง Texture Analyzer ยี่ห้อ STABLE MICRO SYSTEM รุ่น TA-XT2
2. เครื่องคอมพิวเตอร์

วิธีการ

1. เสียบปลั๊กเครื่องสำรองไฟ เปิดสวิทย์เครื่องมาที่ตำแหน่ง on อุปกรณ์เครื่องวัดเนื้อสัมผัสซึ่งประกอบด้วยฐานทดสอบ (test base) และคอมพิวเตอร์ควบคุมการทำงาน ต่อพ่วงเข้ากับเครื่องสำรองไปนี้
2. เปิดคอมพิวเตอร์ และเปิดสวิทย์ของฐานทดสอบซึ่งอยู่ด้านหลังเครื่อง
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 กีดขวางหัววัดหรือไม่ ถ้าไม่มีสิ่งกีดขวางตอบตกลง หน้าต่างใหม่ที่ปรากฏขึ้นจะแจ้งให้ผู้ใช้ยกตุ้มน้ำหนักลงบนคานวัด จากนั้นตอบตกลงเมื่อหน้าจอปรากฏข้อความ Calibration successful ตอบตกลงแล้วเอาตุ้มน้ำหนักลง

7.2 Probe Calibration (การทำขั้นตอนนี้เพื่อหลีกเลี่ยงความเผอเรอที่เกิดจากการใช้หัววัดที่ต่างไปจากหัววัดก่อนหน้านี้

เลือก T.A.-calibrate probe กำหนดระยะทางให้มีความสูงกว่าชิ้นตัวอย่างเล็กน้อย สวมหัววัด จากนั้นตอบตกลง หัววัดจะเคลื่อนที่ลงมาแตะกับฐานแล้วกลับไปยังตำแหน่งที่กำหนดซึ่ง Texture expert จะอ่านตำแหน่งดังกล่าวเป็นศูนย์

8. เลือก T.A.-setting จากแถบคำสั่ง T.A. เพื่อกำหนดค่า parameter ต่างๆ ซึ่งค่าเหล่านี้ได้มาจากเอกสารอ้างอิงของผู้ใช้ หรือดูจากเอกสารแนะนำจากบริษัทผู้ผลิตเครื่อง เมื่อกำหนดค่า แล้วคลิกที่ update

9. เลือก run a test เพื่อทำการวัดตัวอย่าง หลังจากวางตัวอย่างบนฐานวัดเรียบร้อยแล้วทำการตั้งชื่อ file เลือก directory : text_exp เพื่อบันทึกข้อมูล จากนั้นตอบตกลง หัววัดจะเลื่อนลงมาเพื่อวัดตัวอย่าง

10. ข้อมูลที่ได้จะแสดงในรูปกราฟ การหาค่าจากกราฟที่ได้ สามารถทำได้โดยการใช้คำสั่งใน Process data

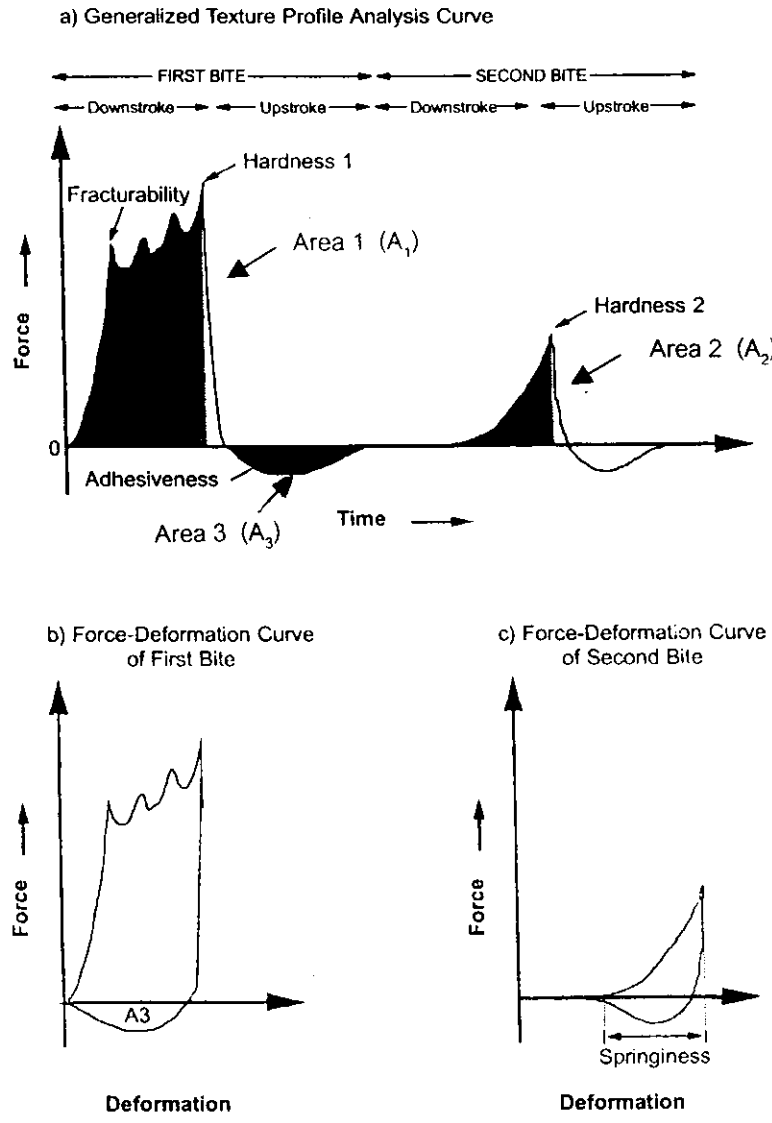
11. การกำหนดค่าใน Process data หรือการเขียน Macro ซึ่งจะใช้ในการหาค่าจากกราฟออกมาเป็นตัวเลข

11.1 เลือกแถบคำสั่ง Process data เลือก Macro เลือก edit

11.2 เลือกคำสั่งย่อยที่ต้องการ จากคำสั่งต่างๆ ที่แสดง

11.3 บันทึกแฟ้มไว้เพื่อเรียกใช้งาน

12. เมื่อหาข้อมูลจากกราฟได้แล้ว ผลที่ได้จะอยู่ในรูปตารางข้อมูล สามารถพิมพ์โดยใช้คำสั่ง File ได้



รูปผนวกที่ 2 กราฟแสดงการวัดเนื้อสัมผัส โดย Texture Profile Analysis

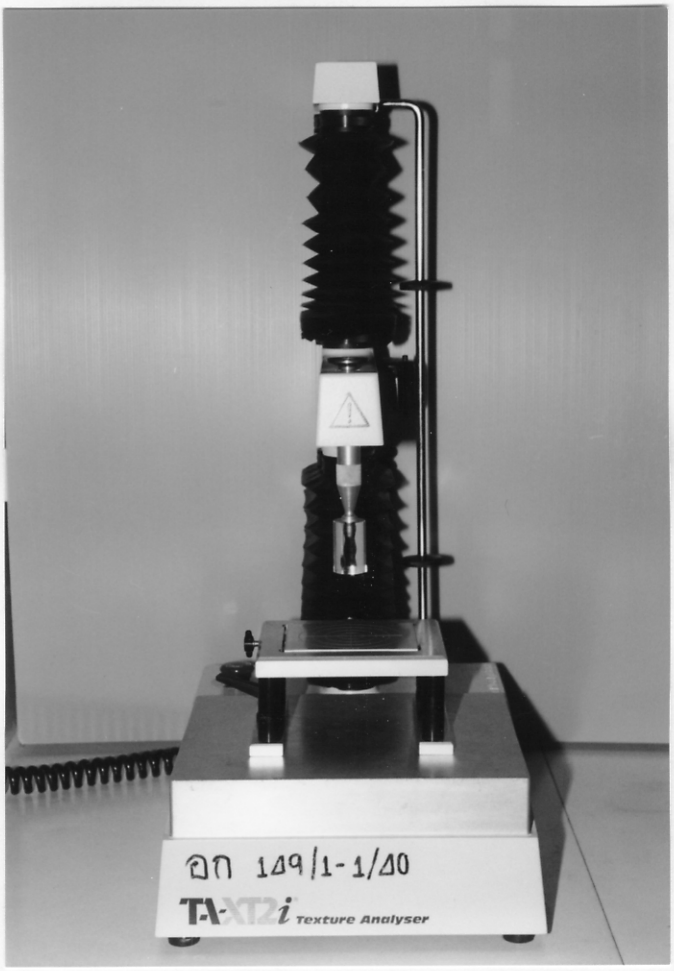
ที่มา : Bourne (1978)

Hardness หมายถึง แรงสูงสุดที่ใช้ในการกดครั้งแรก

Cohesiveness หมายถึง อัตราส่วนระหว่างพื้นที่จากแรงที่เป็นบวก (positive force area, A_2) ในการกดครั้งที่ 2 ต่อพื้นที่จากแรงที่เป็นบวกในการกดครั้งแรก (A_1) (A_2 / A_1)

Adhesiveness	หมายถึง	พื้นที่ที่ได้จากแรงที่เป็นลบ (negative force area, A_3) ในการกดครั้งแรก ซึ่งแสดงถึงงานที่ใช้ในการดึงหัวกดออกจากตัวอย่าง
Springiness	หมายถึง	ส่วนสูงที่ตัวอย่างสามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ระหว่างเวลาที่สิ้นสุดการกดครั้งแรกและเริ่มการกดครั้งใหม่
Gumminess	หมายถึง	Hardness × Cohesiveness
Chewiness	หมายถึง	Gumminess × Springiness หรือ Hardness × Cohesiveness × Springiness

รูปผนวกที่ 3 ไส้กรอกปลาอิมัลชั่นจากเนื้อปลาตาหวาน (บน) และ ไส้กรอกปลาอิมัลชั่นจากเนื้อปลาปากคม (ล่าง)

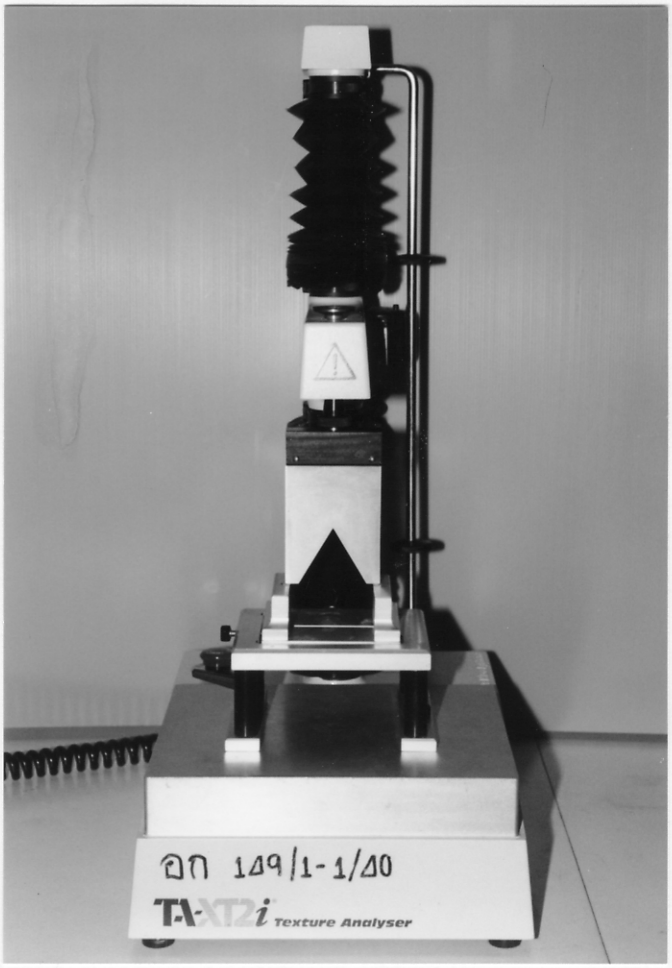


รูปผนวกที่ 4 เครื่อง TA-XT2 Texture Analyzer
ติดตั้งหัว Cylinder เส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร

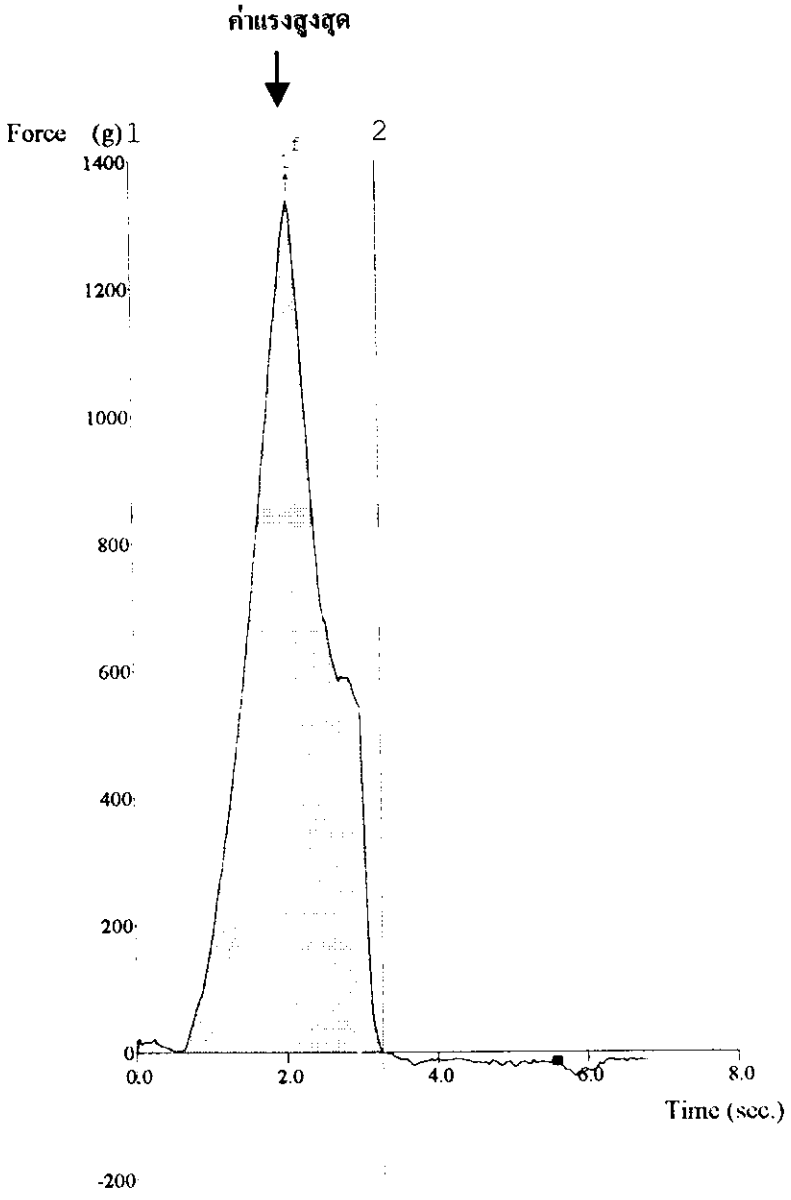
ซ2. การวัดค่าต้านแรงเฉือนโดยใช้เครื่อง TA-XT2 Texture Analyzer

(Cross *et al.*, 1978)

นำตัวอย่างไส้กรอกปลาอิมัลชั่น ทำการวัดพื้นที่หน้าตัดและความสูงของตัวอย่างแล้วป้อนข้อมูลลงในเครื่อง นำตัวอย่างมาวัดค่าแรงเฉือน โดยใช้ Warner – Bratzler Blade ความเร็ว 10 มิลลิเมตรต่อวินาที ทำการตัดชิ้นไส้กรอกจนขาดออกจากกัน วัดค่าแรงสูงสุดที่ใช้ รายงานผลหน่วยเป็นกรัม (g) อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้แสดงดังรูปผนวกที่ 5



รูปผนวกที่ 5 เครื่อง TA-XT2 Texture Analyzer ติดตั้งหัว Warner – Bratzler Blade



รูปผนวกที่ 6 กราฟแสดงการวัดเนื้อสัมผัส โดยใช้ Warner – Bratzler Blade

ที่มา : Cross และคณะ (1978)

ภาคผนวก ญ. ค่าการสูญเสียน้ำหนักหลังทำให้สุก (ดัดแปลงตามวิธีของ Kondiah *et al.*, 1985)

วิธีการ

น้ำหนักอิมัลชั่นก่อนผ่านการต้ม เปรียบเทียบกับน้ำหนักของไส้กรอกที่ผ่านกระบวนการทำให้สุกที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที

การคำนวณ

$$\text{การสูญเสียน้ำหนัก (ร้อยละ)} = \frac{(\text{น้ำหนักอิมัลชั่น} - \text{น้ำหนักไส้กรอกสุก}) \times 100}{\text{น้ำหนักอิมัลชั่น}}$$

ภาคผนวก ฎ. การศึกษาโครงสร้างจุลภาคของไส้กรอกปลาอิมัลชั่น ด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscopy ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM 5800 LV ประเทศญี่ปุ่น (ดัดแปลงจากวิธีของ Jone and Mandigo, 1982)

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างไส้กรอกปลาอิมัลชั่น
2. หลอดทดสอบขนาดเล็ก พร้อมฝาเกลียวปิด
3. บีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร
4. ปิเปตขนาด 5 มิลลิลิตร
5. ใบมีดขนาดเล็ก

สารเคมี

1. สารละลาย glutaraldehyde ความเข้มข้นร้อยละ 2.5
2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.2
3. สารละลายเอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 60 70 80 90 และ 100
4. สารละลาย osmium tetroxide ความเข้มข้นร้อยละ 1.0

วิธีการ

1. ตัดไส้กรอกปลาให้มีขนาด 0.4×0.4×1.0 เซนติเมตร ล้างพื้นผิวด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.2
2. นำตัวอย่างไส้กรอกปลาจุ่มในไนโตรเจนเหลว จากนั้นใช้คีมปากคีบจับส่วนปลายทั้งสองด้านของชิ้นไส้กรอกและหักเพื่อให้ได้ด้านที่จะศึกษาภายใต้ SEM
3. นำไส้กรอกมาทำ primary fixation ด้วย glutaraldehyde ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
4. ล้างออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.2 ล้าง 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที

5. ทำ Post – fixation โดยการแช่ในสารละลาย Osmium tetroxide ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.2 เป็นเวลา 30 นาที
6. ล้างออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.2 ล้าง 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที
7. ดึงน้ำออกจากตัวอย่างด้วยการแช่ในสารละลายเอธานอล จากความเข้มข้นต่ำไปยังความเข้มข้นสูง

ความเข้มข้นร้อยละ 50	ล้าง 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที
ความเข้มข้นร้อยละ 60	ล้าง 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที
ความเข้มข้นร้อยละ 70	ล้าง 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที
ความเข้มข้นร้อยละ 80	ล้าง 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที
ความเข้มข้นร้อยละ 90	ล้าง 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที
ความเข้มข้นร้อยละ 100	ล้าง 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที

8. ทำตัวอย่างให้แห้งด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลว ในสภาวะวิกฤต (Critical point drying)
9. นำตัวอย่างวางบนแท่นวางตัวอย่าง (Aluminium stubs)
10. ฉาบตัวอย่างบน stub ด้วยทองหนา 250 – 300 นาโนเมตร เป็นเวลา 2 นาที
11. ดูตัวอย่างโดยเครื่อง Scanning Electron Microscope ที่ Accelerating voltage 8 KV.

ภาคผนวก ฐ. ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณด่างที่ระเหยได้ (TVB-N) ของกล้ามเนื้อปลาตาหวานที่เก็บรักษาในน้ำแข็งที่ระยะเวลาต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	7	1473.114	210.445	656.341*
Error	40	12.825	0.321	
Total	47	1485.939		

* = มีความแตกต่างทางสถิติ ($P< 0.05$)

ตารางผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณด่างที่ระเหยได้ (TVB-N) ของกล้ามเนื้อปลาปากคมที่เก็บรักษาในน้ำแข็งที่ระยะเวลาต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	7	1182.585	168.941	354.559*
Error	40	19.059	0.476	
Total	47	1201.644		

* = มีความแตกต่างทางสถิติ ($P< 0.05$)

ตารางผนวกที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไตรเมทธิลเอมีน (TMA-N) ของกล้ามเนื้อปลาตาหวานที่เก็บรักษาในน้ำแข็งที่ระยะเวลาต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	7	316.412	45.202	117.092*
Error	40	15.441	0.386	
Total	47	331.853		

* = มีความแตกต่างทางสถิติ ($P< 0.05$)

ตารางผนวกที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไตรเมทธิลเอมีน (TMA-N) ของกล้ามเนื้อปลาปากคมที่เก็บรักษาในน้ำแข็งที่ระยะเวลาต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	7	388.532	55.505	305.779*
Error	40	7.261	0.182	
Total	47	395.793		

* = มีความแตกต่างทางสถิติ ($P< 0.05$)

ตารางผนวกที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าพีเอชของกล้ามเนื้อปลาตาหวานที่เก็บรักษาในน้ำแข็งที่ระยะเวลาต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	7	1.209	0.173	189.375*
Error	40	3.647E-02	9.117E-04	
Total	47	1.245		

* = มีความแตกต่างทางสถิติ ($P< 0.05$)

ตารางผนวกที่ 6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าพีเอชของกล้ามเนื้อปลาปากคมที่เก็บรักษาในน้ำแข็งที่ระยะเวลาต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	7	0.760	0.109	245.074*
Error	40	1.772E-02	4.429E-04	
Total	47	0.778		

* = มีความแตกต่างทางสถิติ ($P< 0.05$)

ตารางผนวกที่ 7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณ Sulfhydryl ของโปรตีนแอกโตไมโอซินจากกล้ามเนื้อปลาตาหวานที่เก็บรักษาในน้ำแข็งที่ระยะเวลาต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	7	2.620E-09	3.743E-10	49.581*
Error	40	3.020E-10	7.549E-12	
Total	47	2.922E-09		

* = มีความแตกต่างทางสถิติ (P< 0.05)

ตารางผนวกที่ 8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณ Sulfhydryl ของโปรตีนแอกโตไมโอซินจากกล้ามเนื้อปลาปากคมที่เก็บรักษาในน้ำแข็งที่ระยะเวลาต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	7	2.687E-09	3.838E-10	139.029*
Error	40	1.104E-10	2.761E-12	
Total	47	2.797E-09		

* = มีความแตกต่างทางสถิติ (P< 0.05)

ตารางผนวกที่ 9 ค่า Hydrophobicity (SoANS) ของโปรตีนแอกโตไมโอซินจากปลาตาหวาน ที่เก็บรักษาในน้ำแข็งที่ระยะเวลาต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	7	1951.122	278.733	584.075*
Error	40	19.089	0.477	
Total	47	1970.217		

* = มีความแตกต่างทางสถิติ (P< 0.05)

ตารางผนวกที่ 10 ค่า Hydrophobicity (SoANS) ของโปรตีนแอกโตไมโอซิน จากปลาปากคม ที่เก็บรักษาในน้ำแข็งที่ระยะเวลาต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	7	1816.468	259.495	387.693*
Error	40	26.773	0.669	
Total	47	1843.241		

* = มีความแตกต่างทางสถิติ ($P< 0.05$)

ตารางผนวกที่ 11 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณ Emulsion capacity ของกล้ามเนื้อปลาตาหวานที่เก็บรักษาในน้ำแข็งที่ระยะเวลาต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	7	31716.583	4530.940	763.642*
Error	40	237.333	5.933	
Total	47	31953.917		

* = มีความแตกต่างทางสถิติ ($P< 0.05$)

ตารางผนวกที่ 12 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณ Emulsion capacity ของกล้ามเนื้อปลาปากคมที่เก็บรักษาในน้ำแข็งที่ระยะเวลาต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	7	39338.479	5619.783	1225.021*
Error	40	183.500	4.588	
Total	47	39521.979		

* = มีความแตกต่างทางสถิติ ($P< 0.05$)

ตารางผนวกที่ 13 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณ Emulsion capacity ของแอกโตไมโอซินจากกล้ามเนื้อปลาตาหวานที่เก็บรักษาในน้ำแข็งที่ระยะเวลาต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	7	8386.667	1198.095	82.913*
Error	40	578.000	14.450	
Total	47	8964.667		

* = มีความแตกต่างทางสถิติ ($P< 0.05$)

ตารางผนวกที่ 14 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณ Emulsion capacity ของแอกโตไมโอซินจากกล้ามเนื้อปลาปากคมที่เก็บรักษาในน้ำแข็งที่ระยะเวลาต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	7	16586.979	2369.568	107.039*
Error	40	885.500	22.138	
Total	47	17472.479		

* = มีความแตกต่างทางสถิติ ($P< 0.05$)

ตารางผนวกที่ 15 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าลักษณะเนื้อสัมผัสโดยวิธี TPA ของไส้กรอกปลาอิมัลชั่นจากกล้ามเนื้อปลาตาหวานที่เก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 0-12 วัน

ปัจจัยคุณภาพ	SV	DF	SS	MS	F
Hardness	Treatment	3	1486312.4	495437.46	9.177*
	Error	44	2375318.7	53984.516	
	Total	48	7.26E+08		
Adhesiveness	Treatment	3	2710.901	903.634	0.842^{ns}
	Error	44	47211.291	1072.984	
	Total	48	242012.27		
Springiness	Treatment	3	1.656E-03	5.518E-04	0.649^{ns}
	Error	44	3.744E-02	8.508E-04	
	Total	48	42.287		
Cohesiveness	Treatment	3	9.701E-02	3.234E-02	31.123*
	Error	44	4.572E-02	1.039E-03	
	Total	48	15.371		
Gumminess	Treatment	3	2798171.1	932723.69	23.069*
	Error	44	1778978.5	40431.330	
	Total	48	2.35E+08		
Chewiness	Treatment	3	2680378.7	893459.55	26.349*
	Error	44	1491959.5	33908.170	
	Total	48	2.07E+08		
Shearforce	Treatment	3	490694.31	163564.77	7.445*
	Error	44	966701.16	21970.481	
	Total	48	1.22E+08		

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

* = มีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 16 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าลักษณะเนื้อสัมผัสโดยวิธี TPA ของไส้กรอกปลาอิมัลชั่นจากกล้ามเนื้อปลาปากคมที่เก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 0-12 วัน

ปัจจัยคุณภาพ	SV	DF	SS	MS	F
Hardness	Treatment	3	4071388.7	1357129.6	38.274*
	Error	44	1560175.6	35458.536	
	Total	48	3.29E+08		
Adhesiveness	Treatment	3	1242.986	414.329	1.782^{ns}
	Error	44	10227.855	232.451	
	Total	48	19015.472		
Springiness	Treatment	3	0.808	0.269	29.632*
	Error	44	0.400	9.086E-03	
	Total	48	45.138		
Cohesiveness	Treatment	3	1.817E-02	6.055E-03	2.869*
	Error	44	9.287E-02	2.111E-03	
	Total	48	2.433		
Gumminess	Treatment	3	489132.87	163044.29	10.658*
	Error	44	673100.38	15297.736	
	Total	48	16349174		
Chewiness	Treatment	3	1597888.7	532629.56	24.504*
	Error	44	956418.04	21736.774	
	Total	48	17277586		
Shearforce	Treatment	3	749666.52	249888.84	117.491*
	Error	44	93582.455	2126.874	
	Total	48	14282258		

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

* = มีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 17 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าลักษณะเนื้อสัมผัสโดยวิธี TPA ของไส้กรอกปลาอิมัลชั่นจากปลาตาหวานและปลาปากคมที่มีสัดส่วนต่างๆ

ปัจจัยคุณภาพ	SV	DF	SS	MS	F
Hardness	Treatment	4	13845146	3461286.5	14.540*
	Error	95	22615443	238057.29	
	Total	100	1.58E+09		
Adhesiveness	Treatment	4	103.949	25.987	0.687^{ns}
	Error	95	3595.832	37.851	
	Total	100	14892.264		
Springiness	Treatment	4	1.321E-03	3.304E-04	1.010^{ns}
	Error	95	3.107E-02	3.270E-04	
	Total	100	84.980		
Cohesiveness	Treatment	4	0.415	0.104	21.997*
	Error	95	0.448	4.715E-03	
	Total	100	25.197		
Gumminess	Treatment	4	15805641	3951410.2	20.736*
	Error	95	18102662	190554.34	
	Total	100	4.25E+08		
Chewiness	Treatment	4	12862011	3215502.7	20.633*
	Error	95	14804912	155841.18	
	Total	100	3.63E+08		
Shearforce	Treatment	4	3067915.9	766978.97	19.701*
	Error	95	3698508.1	38931.664	
	Total	100	1.40E+08		

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

* = มีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 18 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดสอบการยอมรับทางประสาทต่อปัจจัยคุณภาพต่างๆ ของไส้กรอกปลาอิมัลชั่นจากปลาตาหวานและปลาปากคมที่มีสัดส่วนต่างๆ

ปัจจัยคุณภาพ	SV	DF	SS	MS	F
ลักษณะปรากฏ	Treatment	4	3.100	0.775	0.648^{ns}
	Panalist	29	219.800	7.579	15.147*
	Error	295	352.900	1.196	
	Total	300	14228.000		
กลิ่นรส	Treatment	4	35.287	8.822	5.663*
	Panalist	29	239.937	8.274	10.021*
	Error	295	459.550	1.558	
	Total	300	12617.000		
เนื้อสัมผัส	Treatment	4	69.853	17.463	15.950*
	Panalist	29	164.137	5.660	9.478*
	Error	295	322.983	1.095	
	Total	300	12977.000		
ความชอบรวม	Treatment	4	41.967	10.492	10.684*
	Panalist	29	145.467	5.016	9.251*
	Error	295	289.700	0.982	
	Total	300	13268.000		

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

* = มีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 19 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าลักษณะเนื้อสัมผัสโดยวิธี TPA ของไส้กรอกปลาอิมัลชั่นโดยแปรปริมาณไขมัน และปริมาณน้ำต่างๆ

ปัจจัยคุณภาพ	SV	DF	SS	MS	F
Hardness	Treatment	2	2084431.2	1042215.6	3.698*
	Error	57	16062672	281801.26	
	Total	60	1.03E+09		
Adhesiveness	Treatment	2	1340.817	670.409	4.201*
	Error	57	9096.918	159.595	
	Total	60	20533.453		
Springiness	Treatment	2	1.442E-03	7.212E-04	5.162*
	Error	57	7.964E-03	1.397E-04	
	Total	60	50.762		
Cohesiveness	Treatment	2	1.008E-02	5.040E-03	7.449*
	Error	57	3.857E-02	6.766E-04	
	Total	60	18.652		
Gumminess	Treatment	2	1057094.4	528547.19	3.750*
	Error	57	8033513.9	140938.84	
	Total	60	3.25E+08		
Chewiness	Treatment	2	1050101.6	525050.80	4.588*
	Error	57	6522452.7	114428.99	
	Total	60	2.75E+08		
Shearforce	Treatment	2	865229.44	432614.72	4.153*
	Error	57	5937529.8	104167.19	
	Total	60	1.14E+08		

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

* = มีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 20 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสต่อปัจจัยคุณภาพต่างๆ ของไส้กรอกปลาอิมัลชั่นโดยแปรปริมาณไขมัน และปริมาณน้ำต่างๆ

ปัจจัยคุณภาพ	SV	DF	SS	MS	F
ลักษณะปรากฏ	Treatment	2	3.478	1.739	1.480*
	Panalist	29	126.561	4.364	7.939*
	Error	177	207.917	1.175	
	Total	180	8795.000		
กลิ่นรส	Treatment	2	4.044	2.022	1.665^{ns}
	Panalist	29	81.644	2.815	3.126*
	Error	177	214.933	1.214	
	Total	180	8326.000		
เนื้อสัมผัส	Treatment	2	8.011	4.006	3.996*
	Panalist	29	77.111	2.659	3.923*
	Error	177	177.433	1.002	
	Total	180	9146.000		
ความชอบรวม	Treatment	2	10.978	5.489	6.437*
	Panalist	29	55.578	1.916	2.975*
	Error	177	150.933	0.853	
	Total	180	8926.000		

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

* = มีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 21 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าการสูญเสียน้ำหนักหลังทำให้สุก (Cooking loss) ของไส้กรอกปลาอิมัลชั่นจากกล้ามเนื้อปลาตาหวานที่เก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 0-12 วัน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	11.900	3.967	43.691*
Error	20	1.816	9.079E-02	
Total	24	39521.979		

* = มีความแตกต่างทางสถิติ ($P< 0.05$)

ตารางผนวกที่ 22 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าการสูญเสียน้ำหนักหลังทำให้สุก (Cooking loss) ของไส้กรอกปลาอิมัลชั่นจากกล้ามเนื้อปลาปากคมที่เก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 0-12 วัน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	4.861	1.620	38.612*
Error	20	0.839	4.197E-02	
Total	24	1477.427		

* = มีความแตกต่างทางสถิติ ($P< 0.05$)

ตารางผนวกที่ 23 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าการสูญเสียน้ำหนักหลังทำให้สุก (Cooking loss) ของไส้กรอกปลาอิมัลชั่นจากปลาตาหวานและปลาปากคมที่มีสัดส่วนต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	0.284	7.088E-02	31.247*
Error	25	5.671E-02	2.268E-02	
Total	29	0.340		

* = มีความแตกต่างทางสถิติ ($P< 0.05$)

ตารางผนวกที่ 24 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าการสูญเสียน้ำหนักหลังทำให้สุก (Cooking loss) ของไส้กรอกปลาอิมัลชั่นโดยแปรปริมาณไขมันและปริมาณน้ำต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	2	9.992	4.996	207.190*
Error	15	0.362	2.411E-02	
Total	17	10.354		

* = มีความแตกต่างทางสถิติ ($P< 0.05$)