ภาคผนวก ข.

1. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด โดยวิธี Micro-Kjeldahl
    1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน 1 กรัม บนกระดาษกรอง ห่อให้มิดชิดใส่ลงในขวดย่อยโปรตีน (kjeldahl flask)
    2. เติมสารผสม $CuSO_4$ และ K_2SO_4 5 กรัม ($CuSO_4$ 1 ส่วนต่อ K_2SO_4 9 ส่วน)
    3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร และใส่ลูกแก้วกันกระแทกเมื่อเดือด
    4. ย่อยบนเตาไฟ จนกระทั่วได้สารละลายใส
    5. ทิ้งไว้ให้เย็น
    6. เติมน้ำกลั่นร้อนลงไปล้างบริเวณคอขวดให้ทั่ว (ค่อย ๆ เติม)
    7. ย่อยต่อไปจนหมดควัน
    8. ทิ้งไว้ให้เย็น นำมาถ่ายลงในขวดปรับปริมาตร (Volumntric flask) แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร
    9. จัดอุปกรณ์กลั่น (Semi- microdistillation apparatus) เปิดน้ำหล่อเย็นเครื่องควบแน่น (Condenser)
    10. นำขวดรูปกรวยขนาด 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุกรดบอริก 4% ปริมาณ 5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และเติมอินดิเคเตอร์ผสมของ 0.1% เมทิลเรด กับ 0.2% โบรโมครีซอลกรีน เรียบร้อยแล้ว ไปรองรับของเหลวที่จะกลั่น โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลายกรดนี้
    11. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดกลั่น แล้วค่อยๆ เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 60% ลงไป 20 มิลลิลิตร
    12. ทำการกลั่นเป็นเวลา 10 นาที
    13. ไตเตรตสารละลายที่กลั่นได้กับสารละลายมาตรฐาน 0.02 N HCl จนสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง
    14. ทำแบลงค์ (Blank) โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างและทำการวิเคราะห์ตามข้อ 1 - 13

การคำนวณ

$$\% \text{ โปรตีน} = \frac{(a - b) \times N \times 14 \times 6.25}{W}$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักเป็นกรัม

a คือ ปริมาตรของ 0.02 N HCl ที่ใช้ไตเตรดกับตัวอย่าง

b คือ ปริมาตรของ 0.02 N HCl ที่ใช้ไตเตรดกับ blank

N คือ ความเข้มข้นของ HCl เป็นนอร์มอล

2. การหา % Extractability ของโปรตีน

1. การสุ่มตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างมา 22 กรัมหรือมากกว่า ใส่ในถุงพลาสติก (PE) แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นหรือในน้ำแข็งก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์

2. อุปกรณ์

- มีด
- เครื่องชั่งละเอียด
- ช้อนตักสาร
- homogeniser
- บีกเกอร์ขนาด 100 และ 500 มิลลิลิตร
- กรวยแก้ว เส้นผ่าศูนย์กลาง 60 มิลลิลิตร
- ปิเปตแบบกระเปาะ (Bulb pipettes) 10, 20 และ 40 มิลลิลิตร
- กระดาษกรอง Whatmann No 41

3. สารเคมี

3.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer solution)

- 0.03 M KH_2PO_4 1 ลิตร
- 0.03 M Na_2HPO_4 1 ลิตร

ผสมสารละลายทั้งสองในบีกเกอร์ขนาด 2 ลิตรแล้วปรับ pH ให้ได้ 6.85 โดยใช้สารละลายทั้งสองตัวนี้ปรับ เก็บไว้ในตู้เย็น

3.2 สารละลายโพแทสเซี่ยมคลอไรด์ (0.1 M KCl) ชั่ง KCl ให้ได้น้ำหนักแน่นอน ละลายในน้ำกลั่น

3.3 สารละลายโพแทสเซี่ยมคลอไรด์บัฟเฟอร์ (0.5 M KCl buffer) ชั่ง KCl ให้ได้น้ำหนักแน่นอน ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

3.4 สารละลายไตรคลอโรอะซิลิก 25% (Trichloroacetic acid solution 25%, W/V) ละลาย TCA 25 กรัมในน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร

4. วิธีการ

4.1 การหา Total nitrogen ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่แน่นอน 1 กรัมนำไปย่อยในขวดย่อยโปรตีน

4.2 การหา Sarcoplasmic protein nitrogen ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่แน่นอน 10 กรัม ผสมกับสารละลาย 0.1 M KCl 200 มิลลิลิตร ผ่านเครื่อง Homogeniser เป็นเวลา 4 นาที นำของเหลวที่ได้มาแช่ในน้ำเย็น 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่น(Centrifuge)ที่ 12,500 เท่าของแรงโน้มถ่วงโลก หรือ 9,000 รอบต่อนาทีที่ 5 ซ เป็นเวลา 40 นาที ปิเปตสารละลายส่วนใน 20 มิลลิลิตรใส่ในขวดย่อยโปรตีนและกลั่น โดย Kjeldahl method

4.3 การหา Myofibriller protein nitrogen ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่แน่นอน 10 กรัมผสมกับสารละลาย 0.5 M KCl-buffer 200 มิลลิลิตร ผ่านเครื่อง Homoginiser เป็นเวลา 4 นาที นำของเหลวที่ได้มาแช่ในน้ำเย็น 2 ชั่วโมงจากนั้นนำไปปั่น (Centrifuge) ที่ 12,500 เท่าของแรงโน้มถ่วงโลก หรือ 9,000 รอบต่อนาที ที่ 5 ซ เป็นเวลา 40 นาที ปิเปตสารละลายส่วนใน 20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดย่อยโปรตีนและกลั่น โดย Kjeldahl method

4.4 การหา Non-proteinous nitrogen ปิเปตสารละลายส่วน ในจาก 4.2 มา 40 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 25 % TCA 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที ในน้ำเย็น โดยคนเป็นครั้งคราว จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองWhatmann No 41 ปิเปตสารละลายที่กรอง

ได้มา 40 มิลลิลิตร ใส่ในขวดย่อยโปรตีนและกลั่นโดย Kjeldahl method

5. การคำนวณ

5.1 Myofibriller protein nitrogen (MPN)

$$W_{MPN} = W_1 \times \frac{20}{W_1 + 200}$$

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักตัวอย่าง (g) ที่ใช้เพื่อสกัด myofribillar protein

20 คือ ปริมาตร (ml) ของ myofribillar protein ที่ใช้ในการย่อย

200 คือ ปริมาตร(ml) ของ 0.5 M KCl-buffer ที่ใช้สกัด

5.2 Sarcoplasmic protein nitrogen (SPN)

$$W_{SPN} = W_2 \times \frac{20}{W_2 + 200}$$

เมื่อ W_2 คือ น้ำหนักตัวอย่าง (g) ที่ใช้เพื่อสกัด Sarcoplasmic protein

20 คือ ปริมาตร (ml) ของ Sarcoplasmic protein ที่ใช้ในการย่อย

200 คือ ปริมาตร(ml) ของ 0.1 M KCl-buffer ที่ใช้สกัด Sarcoplasmic protein

5.3 Non-proteinous nitrogen (NPN)

$$W_{NPN} = 40^a \times \frac{40^b}{50} \times \frac{W_2}{W_2 + 200}$$

เมื่อ 40^a คือ ปริมาตร(ml) ของสารละลายใสของ Sarcoplasmic protein ที่ใช้เพื่อหา non-proteinous nitrogen

40^b คือ ปริมาตร(ml) ของสารละลายที่ผ่านการกรอง

50 คือ ปริมาตร(ml) ของสารละลายใสของ Sarcoplasmic protein รวมกับ 10 มิลลิลิตร TCA

W_2 คือ น้ำหนักตัวอย่าง (g) ที่ใช้เพื่อสะกัด Sarcoplasmic protein

200 คือ ปริมาตร(ml) ของ 0.1 M KCl ที่ใช้สกัด Sarcoplasmic protein

5.4 Protein nitrogen

$$\text{Protein nitrogen} = \frac{(a - b) \times 0.02 \times 14}{W_1}$$

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักตัวอย่าง(g) หรือปริมาตร(ml) ของตัวอย่าง

a คือ ปริมาตรของ 0.02 N HCl ที่ใช้ไตเตรตกับตัวอย่าง

b คือ ปริมาตรของ 0.02 N HCl ที่ใช้ไตเตรตกับ blank

14 คือ น้ำหนักโมเลกุลของไนโตรเจน

$$\text{5.5 \% Extractability} = \frac{MPN - SPN}{TN - NPN} \times 100$$

เมื่อ MPN คือ myofibrillar protein-nitrogen (N mg/100 g sample)

SPN คือ Sarcoplasmic protein-nitrogen (N mg/100 g sample)

TN คือ Total nitrogen (N mg/100 g sample)

NPN คือ Non proteinous nitrogen (N mg/100 g sample)

3. การหาค่า TVB และ TMA โดยวิธีคอนเวย์

1. การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง 2 กรัมบดผสมกับ 4% TCA 8 มิลลิลิตรในถ้วยบด บดให้ทั่วตั้ง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41 เก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อรอการวิเคราะห์

2. อุปกรณ์

- จาน Conway unit
- ปิเปต
- ไมโครมิวเวต
- ถ้วยบด
- กระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 41
- กรวย

3. สารเคมี

3.1 Mixed indicator ละลาย 0.01 กรัมของbromocresol green และ 0.02 กรัม Methyl red ด้วยแอลกอฮอล์ (ethanol) แล้วปรับจนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.2 Inner ring solution ละลาย 10 กรัมของ Boric acid ใน 200 มิลลิลิตร ethanol แล้วเติม 10 มิลลิลิตร mixed indicator ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.3 0.02 N HCL

3.4 Saturated K_2CO_3 ด้วย 50 มิลลิลิตรน้ำกลั่นต้มประมาณ 10 นาที ทำให้เย็นแล้วกรองผ่านกระดาษกรอง

3.5 50% K_2CO_3 solution เจือจาง saturated K_2CO_3 ด้วยน้ำกลั่น

3.6 4% TCA ละลาย 40 กรัม trichloro acetic acid (CCl_3COOH) ใน 690 มิลลิลิตรน้ำกลั่น

3.7 10% formaldehyde solution เติม 10 กรัม $MgCO_3$ ลงใน 100 มิลลิลิตร formalin (35% formaldehyde solution) เขย่าให้เข้ากัน กรองผ่านกระดาษกรอง แล้วทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 3 เท่า

3.8 grease หรือ vasaline

4. วิธีการ

4.1 การหาค่า TVB

1. ทา grease ที่ขอบฝาจาน conway
2. ปิเปตการละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ชั้นนอกของ conway unit
3. ปิเปต inner ring solution 1 มิลลิลิตร ลงวงกลมชั้นในของ conway unit
4. เอียงจาน conway ในขณะปิดฝา
5. ปิเปต saturated K_2CO_3 1 มิลลิลิตร ใส่ชั้นนอก แต่ให้อยู่คนละด้านกับสารละลายตัวอย่างตามข้อ 2
6. ปิดฝาจาน conway ให้สนิท
7. เอียงหรือหมุนจาน conway เบาๆ ให้ Potassium carbonate ผสมกับสารละลายตัวอย่าง ระวังอย่าให้เกิด การผสมกับ indecator ที่วงกลมชั้นในเป็นอันขาด
8. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 45 นาที
9. เปิดฝา conway แล้วไตเตรตวงกลมชั้นในด้วย 0.02 N HCl จนกระทั่งสีเขียวจางหายไป
10. ทำ blank โดยใช้ 4% TCA จำนวน 1 มิลลิลิตร ดำเนินตามวิธีตั้งแต่ข้อ 1-9

<u>การคำนวณ TVB</u>

$$\text{TVB (มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัมตัวอย่าง)} = \frac{N \times 14 \times (a-b) \times V \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

เมื่อ N คือ ความเข้มข้นของ HCl ที่ใช้ไตเตรต

a คือ ปริมาตร(ml) ของ HCl ที่ใช้ไตเตรตตัวอย่าง

b คือ ปริมาตร(ml) ของ HCL ที่ใช้ไตเตรตกับ blank

v คือ ปริมาตรรวมของตัวอย่าง และ TCA ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

4.2 การหาค่า TMA

1. ทำเช่นเดียวกับการหา TVB ตั้งแต่ 1-3
2. เติม 10% formaldehyde solution 1 มิลลิลิตร ผสมกับตัวอย่าง
3. ปิดฝาทันทีแล้วค่อยๆ เอียงหรือหมุนเบา ๆ ให้สารละลายชั้นนอกผสมกัน
4. ดูด saturated K_2CO_3 1 มิลลิลิตรใส่ชั้นนอก ปิดฝาแล้วค่อยๆ หมุน
5. ทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียล 2 ชั่วโมง
6. ไตเตรต ส่วนที่อยู่ในวงแหวนในด้วย 0.02 N HCl จนกระทั่งสีเขียวเปลี่ยนเป็นสีชมพู
7. ทำ blank โดยใช้ 4 % TCA จำนวน 1 มิลลิลิตร ดำเนินการเช่นเดียวกับตัวอย่าง

การคำนวณ TMA

$$\text{TMA (มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัมตัวอย่าง)} = \frac{N \times 14 \times (c-b) \times V \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

เมื่อ N คือ ความเข้มข้นของ HCl ที่ใช้ไตเตรต

c คือ ปริมาตร(ml) ที่ใช้ไตเตรตตัวอย่าง

b คือ ปริมาตร(ml) ที่ใช้ไตเตรตกับ blank

V คือ ปริมาตรรวมของตัวอย่างและ TCA ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

4. การหาปริมาณ Expressible drip

1. อุปกรณ์
   - กระดาษกรอง
   - นาฬิกาจับเวลา
   - เครื่องอัดความดัน
   - เครื่องชั่ง

2. วิธีการ

1. นำตัวอย่างที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร ตัดให้มีความหนา 0.5เซนติเมตร
2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง (x) กรัม แล้วนำไปวางบนกระดาษกรองที่ซ้อนกัน 3 แผ่น และวางทับด้านบน 2 แผ่น
3. นำตัวอย่างไปผ่านเครื่องอัด โดยเพิ่มความดันจนกระทั่งถึง 10 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตรเป็นเวลา 2 นาที
4. นำตัวอย่างออกมาชั่ง (y) กรัม

3. การคำนวณ

$$\text{Expressible drip (\%)} = \frac{x-y}{x} \times 100$$

แบบทดสอบชิมสำหรับ

Hedonic Scale

ชื่อ.....วันที่.....

ผลิตภัณฑ์.....

โปรดชิมตัวอย่างเหล่านี้แล้วให้คะแนนตามระดับความชอบดังนี้

ชอบมากที่สุด	=	9
ชอบมาก	=	8
ชอบปานกลาง	=	7
ชอบเล็กน้อย	=	6
เฉย ๆ	=	5
ไม่ชอบเล็กน้อย	=	4
ไม่ชอบปานกลาง	=	3
ไม่ชอบมาก	=	2
ไม่ชอบมากที่สุด	=	1

ตัวอย่าง

คุณลักษณะ	_____	_____	_____	_____
สี	.....	.....	.....	.....
รส	.....	.....	.....	.....
เนื้อสัมผัส	.....	.....	.....	.....
คุณลักษณะรวม	.....	.....	.....	.....