ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ข 1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

1.1 วิธีวิเคราะห์ปริมาณความชื้น โดยวิธีอบในตู้อบไฟฟ้า (A.O.A.C.,1990)

อุปกรณ์

1. ตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส
2. ภาชนะหาความชื้น
3. โถดูดความชื้น
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า

ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 – 3 กรัม ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ใส่ลงในขวดชั่งที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้วเกลี่ยตัวอย่างแผ่ออกอย่างสม่ำเสมอ นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักแล้วทำการอบซ้ำอีกครั้งประมาณ 1 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณความชื้น

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

1.2 วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ใช้วิธีเจลดาล (A.O.A.C., 1990)

อุปกรณ์

1. ขวดย่อยโปรตีน
2. ชุดกลั่นโปรตีน
3. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
4. ปิเปตขนาด 5 และ 10 มล.
5. ลูกแก้ว

สารเคมี

1. กรดซัลฟุริกเข้มข้น

2. สารเร่งปฏิกิริยา (คอบเปอร์ซัลเฟต) $CuSo_4$ 1 ส่วน และโพแตสเซียมซัลเฟต (K_2So_4) 9 ส่วน

วิธีการ

ชั่งตัวอย่างประมาณ 1-2 กรัม ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ใส่ลงในหลอดย่อยตัวอย่าง เติมสารผสมของโพแทสเซียมซัลเฟต 1 กรัม เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและเติมกรดกำมะถันปริมาณ 15 มิลลิลิตร นำมาย่อยในตู้ควัน จนกระทั่งหมดฟอง แล้วจึงเพิ่มไฟให้แรงขึ้น ย่อยจนกระทั่งสารละลายใสหรือไม่มีสี ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำไปกลั่นโดยเติมน้ำกลั่นประมาณ 30 มิลลิลิตร และ 32 เปอร์เซ็นต์ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ประมาณ 80 มิลลิลิตรรองรับสิ่งที่กลั่นได้ด้วยร้อยละ 2 ของสารละลายกรดบอร์ริคปริมาณ 50 มิลลิลิตร ที่เติมอินดิเคเตอร์ผสมระหว่างเมทธิลเรดและบรอมครีซอลกรีน 2 – 3 หยดแล้ว โดยให้ปลายเครื่องควบแน่นจุ่มลงในสารละลายกรดบอร์ริค กลั่นจนได้สารละลายในขวดจับแก๊สประมาณ 250 มิลลิลิตร นำสิ่งที่กลั่นได้ไปไดเตรทกับ 0.1 นอร์มัลสารละลายมาตรฐานกรดเกลือจนได้สารละลายเป็นสีชมพู ทำ blank เช่นเดียวกับตัวอย่าง นำปริมาณกรดเกลือที่ใช้ในการไตเตรทไปคำนวณโปรตีนจาก

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{0.0014 \times A \times (B - C) \times 100 \times 6.25}{0.1 \times D}$$

A = ความเข้มข้นของกรดเกลือ

B = ปริมาณกรดเกลือที่ใช้ในการไตเตรทกับตัวอย่าง

C = ปริมาณกรดเกลือที่ใช้ในการไตเตรทกับ Blank

D = น้ำหนักตัวอย่าง

จากการวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้เครื่องชุดย่อยโปรตีน และเครื่องกลั่นโปรตีน มีขั้นตอนการวิเคราะห์ดังนี้

1. การเตรียมตัวอย่าง ควรบดให้ละเอียดและมีความเป็นเนื้อเดียวกัน
2. ชั่งตัวอย่าง 0.2 กรัม
3. การเติมสารเคมี

- หลังจากชั่งตัวอย่างใส่หลอดย่อยสารแล้ว

3.1 เติมคะตะลิส (โพแทสเซียมซัลเฟต + คอบเปอร์ซัลเฟต ร้อยละ 95 /ร้อยละ 5) 5 กรัม

3.2 เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 20 มิลลิลิตร

4. การย่อยสาร

4.1 ทำการอุ่นเครื่องโดยการปรับความร้อนไปที่ตำแหน่ง 10 เป็นเวลา 10 นาที

4.2 เปิดเครื่องทำกำจัดไอกรด

4.3 นำหลอดย่อยสารซึ่งใส่สารตัวอย่างและสารเคมีเรียบร้อยแล้วมาประกอบเข้าเป็นชุด แล้วนำมาเข้าเครื่องย่อย

4.4 ปรับความร้อนมาที่ตำแหน่ง 8 พร้อมทั้งเริ่มจับเวลาในการย่อยสาร (ขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่าง)

4.5 หลังจากย่อยตัวอย่างเสร็จ นำหลอดย่อยสารออกจากเครื่องย่อยสารมาวางไว้บนตะแกรง เพื่อให้หลอดย่อยสารเย็น ก่อนที่จะนำไปเข้าเครื่องกลั่นสาร

5. การเตรียมเครื่องกลั่นสาร

5.1 เปิดเครื่องกลั่นสาร พร้อมเปิดน้ำหล่อเย็น

5.2 ทำการอุ่นเครื่อง 1 ครั้ง

6. การกลั่นสาร

6.1 เตรียมกรดบอร์ริคร้อยละ 2 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในฟลาส์กรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

6.2 เติมมิกซ์อินดิเคเตอร์ 2 – 3 หยด

6.3 นำฟลาส์กดังกล่าวใส่เข้าในเครื่องกลั่น

6.4 นำหลอดย่อยสารจากข้อ 3.4 พร้อมน้ำกลั่น ประมาณ 50 มิลลิลิตร

6.5 นำหลอดย่อยสารดังกล่าวเข้าเครื่องกลั่น

6.6 เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 32 โดยกดปุ่ม (NaOH) รอจนกระทั่งสีในหลอดกลั่นสารเป็นสีน้ำตาลหรือสีฟ้า (ใช้ด่างประมาณ 70 – 80 มิลลิลิตร)

6.7 ตั้งเวลาในการกลั่นประมาณ 4 นาที

6.8 กดปุ่ม Start

6.9 หลังจากกลั่นเสร็จนำสารที่ได้ไปทำการไตเตรทด้วยกรดเกลือ 0.1 นอร์มัล

$$\text{สูตร } \%\ N_2 = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 1400}{S}$$

V_1 = ปริมาตรกรดที่ใช้ในการไตเตรท

V_2 = ปริมาตรกรดที่ใช้ในการไตเตรท blank

N = นอร์มาลิตี้ของกรด

S = น้ำหนักของสารตัวอย่าง หน่วยเป็นมิลลิกรัม

% P = % N_2 X 6.25

% P = ปริมาณโปรตีนร้อยละ

% N_2 = ปริมาณไนโตรเจนร้อยละ

6.25 = ค่าแฟคเตอร์

1.3 วิธีวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

ชั่งตัวอย่างประมาณ 10 กรัม ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน วางบนกระดาษกรอง นำไปอบแห้ง แล้วห่อตัวอย่างใส่ลงในทิบเบิลประกอบเข้ากับชุดสกัดไขมัน (Soxhlet extraction appartus) โดยทำการสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ที่มีจุดเดือด 35 – 60 องศาเซลเซียส ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ใช้เวลาสกัดประมาณ 30 นาที เมื่อไขมันถูกสกัดออกจากตัวอย่างแล้ว จึงเอาตัวอย่างออก นำปิโตรเลียมอีเทอร์ที่มีไขมันปนอยู่ด้วยไประเหยที่อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส ส่วนที่เหลืออยู่ในภาชนะใส่ตัวทำละลายขั้นสุดท้ายคือไขมันจากตัวอย่าง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก คำนวณหาปริมาณไขมันจาก

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักไขมัน}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

จากการวิเคราะห์ไขมันโดยใช้เครื่องสกัดไขมัน โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ดังนี้

1. อบบีกเกอร์ 2 – 3 ชั่วโมง อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส สำหรับรองรับไขมันที่สกัดแล้ว ชั่งน้ำหนักและบันทึกผล

2. ชั่งสารตัวอย่าง 5 กรัม

3. ใส่สารตัวอย่าลงในทิมเบิลแล้วนำเข้าประกอบในเครื่อง จากนั้นกดทิมเบิลให้ลงอยู่ในตำแหน่งพร้อมที่สกัด

4. เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ลงในบีกเกอร์ๆ ละ120 - 140 มิลลิลิตร แล้วประกอบเข้ากับเครื่อง

5. ยกเตาล่างขึ้น

6. ขั้นตอนการตั้งโปรแกรมเครื่อง

6.1 กด Select แล้วกด ∇ หรือ Δ เพื่อเลื่อนหา method ที่ต้องการในที่นี้ใช้ Soxhlet standard

6.2 ต่อไปกด >> ตัวเลขในช่อง Step จะกระพริบให้กด ∇ หรือ Δให้เป็น Step1

6.3 ต่อไปกด >> ตัวเลขในช่องHeating element จะกระพริบให้กด ∇ หรือΔ เพื่อตั้งระดับความร้อนของ Heating element (เตาตัวล่าง) ในที่นี้ให้เลื่อนไปที่เลข 9 (180 องศาเซลเซียส ซึ่ง 1 ระดับ = 20 องศาเซลเซียส)

6.4 ต่อไปกด >> ตัวเลขในช่อง Cycle จะกระพริบให้กด∇ หรือΔ เพื่อตั้ง Cycle (จำนวนรอบของการสกัด) ในที่นี้ให้ตั้งเลข 20

6.5 ต่อไปกด >> ตัวเลขในช่อง H:Min จะกระพริบให้กด∇ หรือ Δ เพื่อตั้งเวลาในการสกัด ในที่นี้ให้ตั้งที่ 2:00 (2 ชั่วโมง)

6.6 ต่อไปกด >> จะเป็น Step 2 ให้ตั้ง Heating โดยกด∇ หรือ Δในที่นี้ให้ตั้งไปที่นี้เลข 9 (180 องศาเซลเซียส)

6.7 ต่อไปกด >> เพื่อตั้งเวลากด∇ หรือΔ เพื่อตั้งเวลาในการ Rinsing ในที่นี้ให้ตั้ง 00.05 (5 นาที)

6.8 ต่อไปกด >> จะเป็น Step 3 ให้ตั้ง Heating โดยกด ∇ หรือΔ ในที่นี้ตั้งไปที่เลข 5 (100 องศาเซลเซียส)

6.9 ต่อไปกด >> ตัวเลขในช่อง H:Min จะกระพริบให้กด∇ หรือΔ เพื่อตั้งเวลาในการทำงาน ในที่นี้ให้ตั้งที่ 00.10 (10 นาที)

เมื่อตั้งโปรแกรมเสร็จเรียบร้อยแล้วให้กด Start เครื่องจะทำงานโดยอัตโนมัติจนหมดเวลาเครื่องก็จะหยุด

6.10 นำบีกเกอร์ที่มีไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 105 ^{0}C ประมาณ 2-3 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เย็นลงในโถดูดความชื้น

6.11 นำบีกเกอร์ดังกล่าวมาชั่งแล้วคำนวณค่า

$$\% \text{ Fat} = \frac{(B - A) \times 100}{C}$$

A = น้ำหนักบีกเกอร์ก่อนทำการสกัด

B = น้ำหนักบีกเกอร์หลังทำการสกัด

C = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

1.4 วิธีวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (A.O.A.C., 1990)

อุปกรณ์

1. เตาเผา (Muffle Furnace)
2. ถ้วยกระเบื้อง (Crucible)
3. โถดูดความชื้น
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด

ชั่งตัวอย่างประมาณ 10 กรัม ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ใส่ในครูซิเบิลที่ทราบน้ำหนักแน่นอน เผาจนหมดควัน แล้วจึงนำเข้าเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 525 องศาเซลเซียส จนได้เถ้าสีเทาอ่อนหรือสีขาวสม่ำเสมอ ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนัก คำนวณหาปริมาณเถ้าจาก

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

1.5 วิธีวิเคราะห์ปริมาณด่างระเหยทั้งหมดโดยวิธีคอนเวย์ (Hasegawa, 1987)

อปกรณ์

1. จานระเหยแบบคอนเวย์ (Conway Unit)
2. ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
3. ถ้วยบด
4. กระดาษกรอง

สารเคมี

1. วาสลีน
2. อินดิเคเตอร์ ใช้ Fashiro indicator วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน
3. สารละลายวงแหวนชั้นโน (inner ring) ละลายกรดบอริก 10 กรัม ในเอธานอล ปริมาตร 200 มิลลิตร เติมอินดิเคเตอร์ 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นได้ 1000 มิลลิลิตร
4. สารละลายอิ่มตัวของโพแทสเซียมคาร์บอเนต สารละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนต 60 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดประมาณ 10 นาที ทำให้เย็นแล้วกรองน้ำในกระดาษกรอง

5. สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid) เข้มข้นร้อยละ 4 (ซึ่งกรดไตรคลอโรอะซีติก 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร)

6. สารละลายกรดไฮโดรคลอริค 0.02 นอร์มัล

วิธีการ

1. สกัดตัวอย่างอาหาร นำตัวอย่างอาหารทราบน้ำหนักประมาณ 2 กรัม ใส่ในถ้วยบด เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก เข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บดให้ละเอียด ปล่อยทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41 สารละลายที่ได้หากไม่สามารถนำไปวิเคราะห์ได้ทันที นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2. วิเคราะห์

2.1 ทาวาสลีนที่ขอบจานคอนเวย์

2.2 ปิเปตสารละลายวงแหวนชั้นใน 1 มิลลิลิตร ใส่ในขอบจานชั้นใน

2.3 ปิเปตสารละลายอิ่มตัวของโพแทสเซียมคาร์บอเนต 1 มิลลิลิตร ใส่ในขอบจานชั้นนอก

2.4 ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ 1 มิลลิลิตร ลงในขอบจานชั้นนอกอีกชั้นหนึ่ง ระวังไม่ให้ผสมกับสารละลายอิ่มตัวของโพแทสเซียมคาร์บอเนต

2.5 ปิดจานคอนเวย์ให้สารละลายตัวอย่าง และสารละลายอิ่มตัวของโพแทสเซียมผสมกันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.6 ไตเตรทสารละลายชั้นในด้วยสารละลายกรดเกลือเข้มข้น 0.02 นอร์มัล จนกระทั่งได้จุดยุติสีม่วง

2.7 ทำ blank ด้วยวิธีการเดียวกัน แต่ใช้สารละลายกรดไตเตรทคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด} = \frac{(a-b)\times N\times 14\times V\times 100}{W}$$

(มก.ไตรเจน / 100 ก.ตัวอย่าง)

เมื่อ a = ปริมาณสารละลายกรดเกลือที่ใช้เป็นมิลลิลิตร

b = ปริมาณของสารละลายกรดเกลือที่ใช้กับ blank เป็นมิลลิลิตร

N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือเป็นนอร์มัล

V = ปริมาตรรวมของตัวอย่างและกรดไตรคลอโรอะซิติกที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างเป็นมิลลิลิตร

W = น้ำหนักของตัวอย่างเป็นกรัม (น้ำหนักกรัมสมมูลของไนโตรเจน = 14.00)

ข 2 การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

2.1 วิธีวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Viable Count โดยวิธี Pour plate A.O.AC., 1990)

2.1.1 สุ่มตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ เทสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.2) 225 มิลลิลิตรลงไป เพื่อให้ได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 1 : 10

2.1.2 นำไปตีป่นให้ละเอียด โดยใช้เครื่องตีป่นอาหารเป็นเวลา 2 นาที

2.1.3 ปิเปตตัวอย่างอาหารเจือจาง 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.2) 9 มิลลิลิตร จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับ คือ 1 : 100 1 : 1000 1 : 10000 ตามลำดับ

2.1.4 ปิเปตตัวอย่างอาหารที่ระดับความเจือจางต่างๆ 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อโดยทำระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ

2.1.5 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Standard plate count agar ที่หลอมเหลว และมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส 15 – 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากับตัวอย่างอาหารอย่างทั่วถึง

2.1.6 ปล่อยทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว กลับจานเพาะเชื้อ

2.1.7 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.1.8 นับจำนวนจุลินทรีย์ในจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30 – 300 โคโลนี

2.1.9 หาผลเฉลี่ยของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดต่ออาหาร 1 กรัม รายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัมตัวอย่าง (CFU / g)

CFU / g = Average No.of colonies x dilution factor

2.2 วิธีวิเคราะห์เชื้อ *Coliforms* และ *Escherichia coli* (Hasegawa, 1987)

2.2.1 เตรียมตัวอย่างอาหารเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

2.2.2 ปิเปตตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีอาหาร Lauryl sulfate tryptose broth 10 มิลลิลิตร ทำระดับเจือจางละ 3 หลอด

2.2.3 บ่มที่อุณหภูมิ 35 – 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.2.4 ตรวจดูหลอดที่ให้ผลบวก โดยจะเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ (presumptive test)

2.2.5 ใช้ลูปถ่ายเชื้อจากหลอดที่มีก๊าซ ลงใน Brilliant green lactose bile (BGLB) broth และ E.C. broth

2.2.5.1 BGLB broth นำไปบ่มที่ 35 – 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนหลอดที่เกิดก๊าซทั้งหมดในขั้นนี้ (confirm test) นำไปหาค่า MPN ของ *Faecal coliform* จากตาราง MPN

2.2.5.2 E.C broth นำไปบ่มในหม้ออังไอน้ำ (water bath) ที่อุณหภูมิ 44.5± 0.2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนหลอดที่เกิดก๊าซทั้งหมด นำไปหาค่า MPN ของ *Faecal coliform* จากตาราง MPN

2.3 การตรวจ *E.coli*

2.3.1 ใช้ลูปแตะเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกในข้อ 4.2 ลงบน Eosin methylene blue (EMB) agar บ่มที่ 35 - 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3.2 เลือกโคโลนีซึ่งมีสีเข้มคล้ำ อาจมีเงาโลหะหรือไม่มีก็ได้ ถ่ายเชื้อลงใน NA slant บ่มที่อุณหภูมิ 35 - 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3.3 ทดสอบปฏิกิริยา IMVic ได้แก่

2.3.3.1 Indole production ถ่ายเชื้อลงใน Tryptophane broth บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบการอินโดล โดยเติม Kovac's reagent 0.2 – 0.3 มิลลิลิตร ลงในหลอดถ้าเกิดสีชมพูหรือสีแดงที่ผิวหน้า แสดงว่าปฏิกิริยาให้ผลบวก

2.3.3.2 Voges – Proskauer – reactive compounds ถ่ายเชื้อลงใน NA slant บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปิเปตเชื้อ 0.7 มิลลิลิตร ลงในจานเบื้องหลุมสีขาว เติมสารละลาย α - napthol 0.1 มิลลิลิตร โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 40 ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร และเกร็ด creatine 2 – 3 เกล็ด ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ถ้ามีสีชมพูเกิดขึ้นแสดงว่าให้ผลบวก

2.3.3.3 Methyl red reactive compounds โดยบ่มเชื้อในหลอด MR – VP medium ต่ออีก 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส หลังทำการทดสอบปฏิกิริยา Voges – Proskauer แล้ว จากนั้นตรวจสอบปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายเมทธิลเรด 5 หยดลงในหลอด เมื่อมีสีแดงเกิดขึ้น แสดงว่าให้ผลบวก ถ้าเกิดสีเหลืองแสดงว่าให้ผลลบ

2.3.3.4 Citrate utilization ถ่ายเชื้อลงใน Koser's citrate broth บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะขุ่นแสดงว่าให้ผลบวก

2.3.4 ย้อมสีแบบแกรม

2.3.5 คำนวณค่า MPN ของ *E.coli* ต่อกรัมของอาหาร จากหลอดที่ทดสอบแล้วว่า มีแบคทีเรียรูปแท่ง ติดสีแกรมลบ และให้ผลทดสอบ IMV ic เป็น ++-- หรือ -+--

2.4 วิธีวิเคราะห์เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (Hasegawa, 1987 ; Speck, 1984)

2.4.1 เตรียมตัวอย่างอาหารเจือจาง 1 : 10 โดยสุ่มตัวอย่างอาหาร 50 กรัม เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3 ปริมาณ 450 มิลลิลิตร ตีป่นให้เข้ากัน

2.4.2 ปิเปตตัวอย่างอาหารเจือจาง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Trypticase soy broth + เกลือ ร้อยละ 3 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ทำระดับความเจือจางละ 3 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 35 – 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.4.3 นับจำนวนหลอดที่มีการเจริญในแต่ละระดับความเจือจาง

2.4.4 เลือกหลอดที่มีความเจือจางมากที่สุด ซึ่งมีการเจริญ 3 หลอด Streak ลงบน Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose agar บ่มที่ 35 – 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.4.5 สังเกตโคโลนีที่มีลักษณะกลม สีเขียว หรือสีเขียวอมฟ้า เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 – 3 มิลลิเมตร นับจำนวนหลอดที่ให้ลักษณะโคโลนีดังกล่าวไปหาค่า MPN

2.4.6 ทำการทดสอบยืนยันโดยทดสอบทางชีวเคมีบางประการและความสามารถในการทนเกลือ

2.4.6.1 เขี่ยเฉพาะโคโลนีเดี่ยวๆ จากข้อ 3.4 Streak ลงบน Trypticase soy Agar + โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3 บ่มที่อุณหภูมิ 35 –37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บหลอดนี้ไว้ทดสอบคุณสมบัติอื่นๆ

2.4.6.1.1 เขี่ยเชื้อลง Triple Sugar Iron agar ทั้งที่ผิวหน้า (slant) แทงลูปลงก้นหลอด (butt) บ่มที่ 35 – 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง *Vibrio parahaemolyticus* จะให้ผลบวกดังนี้ เกิดด่างที่ slant (สีแดง) เกิดกรดที่ butt (สีเหลือง) และไม่เกิดก๊าซหรือ H_2S

2.4.6.1.2 เขี่ยเชื้อลง Motility medium โดยแทงเข็มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 35 – 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง *Vibrio parahaemolyticus* สามารถเคลื่อนที่ได้จึงเกิดการเจริญนอกรอยเข็ม

2.5 วิธีวิเคราะห์เชื้อ *Staphylococcus aureus* (Hasegawa, 1987 ; Speck, 1984)

2.5.1 เตรียมตัวอย่างอาหารเช่นเดียวกับการวิเคราะห์จุลินทรีย์ทั้งหมด

2.5.2 ปิเปตตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตร ลงในโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10 หลอด Trypticase soy broth 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.5.3 ปิเปตอาหารตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร 0.1 ลงบน Mannitol salted egg yolk (MSEY) agar และ Baird Parker (BP) agar เกลี่ยให้ทั่วผิวอาหาร บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.5.4 สังเกตโคโลนีของ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเมื่ออยู่บน MSEY agar โคโลนีมีสีนวลหรือสีเหลืองรอบๆ ดำเป็นมัน มีขอบ ตกตะกอนรอบๆ

2.5.5 ทดสอบเอนไซม์ coagulase โดยตรวจการแข็งตัวของน้ำเลือด เชื้อที่ให้ผลทดสอบเอนไซม์ coagulase จัดเป็น *Staphylococcus aureus*

2.6 วิธีวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella sp.* (Hasegawa, 1987 ; Speck, 1984)

2.6.1 สุ่มตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ลงในถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ เติมหลอด Trypticase soy broth 225 มิลลิลิตร ตีป่น 2 นาที แล้วนำไปบ่มที่ 35 – 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.6.2 ปิเปตตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตร ลงใน Selenite cystine broth 10 มิลลิลิตร และ Tetrathionate broth base 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 35 – 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.6.3 Streak ลงบน Xylose lysine decarboxylase (XLD) agar และ Hektoen enteric agar (HE) บ่มที่ 35 – 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.6.4 ตรวจดูโคโลนีที่มีลักษณะของ *Salmonella* บน Hektoen enteric agar โคโลนีจะไม่มีสีใสหรือทึบ อาจมีหรือไม่มีจุดสีดำตรงกลาง ส่วนบน XLD agar โคโลนีจะใส อาจมีหรือไม่มีจุดสีดำตรงกลางเช่นเดียวกัน อาหารเลี้ยงเชื้อรอบๆ จะเป็นสีบานเย็น

2.6.5 ทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีบางประการ โดยเขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่สงสัย ลงในอาหารเพาะเชื้อต่อไปนี้ บ่มที่อุณหภูมิ 35 –37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.6.5.1 Triple sugar iron agar เชื้อ *Salmonella* จะให้ผลบวกดังนี้ เกิดด่างที่ slant (สีแดง) เกิดกรดที่ butt (สีเหลือง) อาจสร้างหรือไม่สร้างก๊าซและ H_2S ก็ได้

2.6.5.2 Lysine indole motility medium เชื้อ *Salmonella* จะให้ผลการทดสอบเป็น Lysine+ indole- และmotility+

2.6.5.3 Urea agar เชื้อ *Salmonella* จะไม่สร้าง urease อาหารจะไม่เปลี่ยนสี

2.6.6 ทดสอบการตกตะกอนด้วย *Salmonella antiserum*

2.6.7 เชื้อที่ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีที่แสดงว่าเป็น *Salmonella* และตกตะกอนกับ antiserum จัดว่าเป็น *Salmonella sp.*

ข 3 การวัดค่าเนื้อสัมผัสทางกายภาพ (ดัดแปลงจากวิธีของ Bourne, 1982)

อุปกรณ์

1. เครื่อง Texture Analyzer รุ่น TA – XT2I
2. หัวกดรูปทรงกลม
3. โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Texture Expert สำหรับเก็บและวิเคราะห์ข้อมูล

วิธีทำ

1. นำตัวอย่างลูกชิ้นปลาทุกสูตรที่มีขนาดใกล้เคียงกัน วางบนแท่นรองรับของเครื่อง Texture Analyzer ใช้หัวกดรูปทรงกลม หัวกดทดสอบความเร็ว 5 มม./วินาที 75 % TPA
2. กดบนชิ้นตัวอย่างด้วยความเร็ว 5 มม./วินาที เป็นระยะทางร้อยละ 75 ของความสูงเดิม
3. ยกหัวกดขึ้นด้วยความเร็ว 5 มม./วินาที จนถึงระดับอ้างอิงแล้วกดลงอีกครั้ง ด้วยความเร็วและระยะทางเท่าเดิม

การคำนวณ

ความแข็ง = แรงสูงสุดที่ใช้ในการกดตัวอย่างในการกดครั้งแรก (Bourne, 1968)

การเกาะตัว = พื้นที่ใต้กราฟของการกดครั้งแรก / พื้นที่ใต้กราฟของการกดครั้งหลัง (Friedman, et al, 1963)