# บทที่ 3
# วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

## 3.1 วัตถุดิบ

สุ่มเก็บตัวอย่างเนื้อลำไยอบแห้งเนื้อสีทอง และเนื้อลำไยอบแห้งสีน้ำตาลดำมาวิเคราะห์ทางกายภาพ ทางเคมี และทางจุลินทรีย์ ได้ทั้งหมด 38 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างเนื้อลำไยอบแห้งสีทอง 23 ตัวอย่าง และเนื้อลำไยอบแห้งสีน้ำตาลดำ 15 ตัวอย่าง จากแหล่งผลิตจำนวน 15 แห่ง ในจังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดลำพูน โดยแต่ละแห่งสุ่มเก็บตัวอย่างเนื้อลำไยอบแห้งมา 1 กิโลกรัม นำมาวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง (triplicate with triplicate determinations)

## 3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

(1) เครื่องวัดสี (Chroma meter, Minolta CR-300, Japan)

(2) เครื่องวัดพีเอช (pH meter, HANA: 213, U.S.A.)

(3) เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Balance Dielhemim: HF-3000G, Switzerland)

(4) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Electric analytical balance, Sartorius: A120S, Germany)

(5) ตู้บ่ม (Incubator, Gallenkamp, England)

(6) ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert: UM100-UM800, Germany)

(7) ตู้ดูดควัน (Hood, Toplab Design and Technology, England)

(8) อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, Gallenkamp, England)

(9) เครื่องวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (Handrefractometer, Atago: N1, Japan)

(10) เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้า (Hot plate and Magnetic stirrer, Whatman: HPMS, England)

(11) เครื่องปั่น (Blender, National, Thailand)

(12) กระดาษกรองเบอร์ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร (Whatman, England)

(13) เตาไมโครเวฟ (Microwave oven, National: NN-K652, Japan)

(14) บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 250, 600 และ 1,000 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(15) ฟลาส์ค ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร

(16) ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

(17) แท่งแม่เหล็ก (Magnetic bar)

(18) กรวยกรอง (Funnel)

(19) หลอดหยด (Dropper)

(20) โถดูดความชื้น (Desiccator)

(21) จานโลหะสำหรับหาความชื้น (Moisture can)

(22) ตู้อบสุญญากาศ (Vacuum drying oven)

(23) ชุดเครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์

(24) เตาให้ความร้อน (Heating mantle) ใช้ฟลาส์คขนาด 1 ลิตร สามารถปรับความร้อนได้

(25) ถังก๊าซไนโตรเจนพร้อมหัวควบคุม ที่มีไนโตรเจนบริสุทธิ์ 99.9%

(26) ปิเปตต์ ขนาด 1, 5, 10 และ 20 มิลลิลิตร

**3.3 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ**

**3.3.1 การวัดสี** ทำการวัดสีเนื้อลำไยอบแห้งสีทองและเนื้อลำไยอบแห้งสีน้ำตาลดำ โดยใช้เครื่องวัดสี (Chroma meter, Minolta CR-300, Japan)

**วิธีวิเคราะห์**

การใช้เครื่อง Chroma meter ก่อนใช้เครื่องทุกครั้งได้ปรับมาตรฐานของเครื่องวัดสี (calibration) โดยใช้แผ่นเทียบสีมาตรฐานสีขาว วัดสีเนื้อลำไยอบแห้งสีทองและเนื้อลำไยอบแห้งสีน้ำตาลดำ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เกรดละ 10 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย รายงานค่าสีที่วัดได้เป็นค่า L*, a* และ b*

นำค่า a* และ b* มาคำนวณหาค่า Chroma (C*) และ Hue angle ($H^{\circ}$) โดยใช้สูตรต่อไปนี้ (สุคนธ์ชื่น และวรรณวิบูลย์, 2543)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Chroma ; $C^* = SQRT (a^2+b^2)$

Hue angle ; $H^\circ = ATAN (b^*/a^*)/6.2832 X360$

เมื่อ L* = The lightness factor values เป็นค่าแสดงถึงความสว่าง (lightness) ของวัตถุ ถ้าค่า L* เข้าใกล้ 0 แสดงว่าวัตถุมีความทึบ ถ้าค่า L* เข้าใกล้ 100 แสดงว่าวัตถุมีความสว่าง ถ้าค่า L* เท่ากับ 100 แสดงว่า วัตถุมีสีขาว และถ้าค่า L* เท่ากับ 0 แสดงว่าวัตถุมีสีดำ

a* = The chromaticity coordinates เป็นค่าแสดงสีแดงและสีเขียวของวัตถุ ถ้าค่า a*เป็นบวก (+) แสดงว่าวัตถุมีสีแดง ถ้าค่า a* เป็นลบ (-) แสดงว่าวัตถุมีสีเขียว

b* = The chromaticity coordinates เป็นค่าแสดงสีเหลืองและสีน้ำเงินของวัตถุ ถ้าค่า b* เป็นบวก (+) แสดงว่าวัตถุมีสีเหลือง ถ้าค่า b* เป็นลบ (-) แสดงว่าวัตถุมีสีน้ำเงิน

ถ้าค่า ทั้ง a* และ b* เท่ากับ 0 แสดงว่าวัตถุมีสีเทา

C* = เป็นค่าแสดงถึงความเข้มของสี ถ้าค่า C* เท่ากับ 0 แสดงว่าวัตถุมีสีเทา หากมีค่าเพิ่มมากขึ้น แสดงว่าวัตถุมีความเข้มของสีมากขึ้น

$H^\circ$ = เป็นค่าแสดงสีที่ปรากฏให้เห็น คำนวณได้อยู่ในรูปขององศาในวงกลม ซึ่งจะมีค่าเริ่มต้นตั้งแต่ $0^\circ$ จนถึง $360^\circ$ ซึ่งค่า $H^\circ$ นี้บอกถึงสีที่แท้จริงที่ปรากฏให้เห็น โดยสีในแถบแกนหลักได้แก่ $0^\circ$ และ $360^\circ$ สีแดง $90^\circ$ สีเหลือง $180^\circ$ สีเขียว $270^\circ$ สีน้ำเงิน ดังแสดงในภาคผนวก ค

**3.3.2 การวัดเนื้อสัมผัส** ทำการวัดเนื้อสัมผัสของเนื้อลำไยอบแห้งสีทอง เป็นค่าแรงเฉือนด้วยเครื่องTexture Analyzer โดยตั้งอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ 2.0 มิลลิเมตรต่อวินาที ขนาด Load Cell 50 นิวตัน อ่านค่าเป็นหน่วยนิวตัน (N) ทำการวัดตัวอย่างเนื้อลำไยอบแห้งสีทองตัวอย่างละ 10 ซ้ำ

**3.4 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี**

**3.4.1 ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ (Total Titratable Acidity)** ตามวิธี (AOAC, 2000): Method 942.15 วัดปริมาณกรดทั้งหมดในตัวอย่างเนื้อลำไยอบแห้งโดยวิธีการไทเทรชันและคำนวณผลในรูปของกรดซิตริกต่อ 100 กรัมเนื้อลำไย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.4.1.1 สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเคมี**

(1) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, AR Grade, E. Merck, Germany) (NaOH) จำนวน 4 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือด และปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาปรับมาตรฐาน (standardization) โดยการไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต (Potassium hydrogen phthalate, AR Grade, E. Merck, Germany) ($KHC_8H_4O_4$) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เพื่อหาความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

(2) สารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เตรียมโดยชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต (ที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง) น้ำหนัก 0.5000 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือด จำนวน 25 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร ปิเปตต์สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 10 มิลลิลิตรใส่ลงในฟลาส์คขนาด 125 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ ลงไป 2-3 หยด นำไปไทเทรตกับสารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนกระทั่งได้จุดยุติเป็นสีชมพูที่ถาวร บันทึกปริมาตรของสารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลตที่ใช้ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย ความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์คำนวณได้ดังนี้

$$\text{นอร์มัลลิตี้ของ NaOH} = \frac{0.1\ \text{N}\ (KHC_8H_4O_4) \times \text{ปริมาตร}\ KHC_8H_4O_4\ \text{ที่ใช้ไทเทรต (ml)}}{\text{ปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 ml}}$$

**วิธีวิเคราะห์**

(1) ชั่งตัวอย่างเนื้อลำไยอบแห้งที่ปั่นละเอียดด้วยเครื่องปั่น 10 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร

(2) เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย คนให้ละลายเข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(3) ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร ผสมให้เข้ากัน

(4) กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4

(5) ปิเปตต์ของเหลวที่กรองได้ 10 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาส์คขนาด 125 มิลลิลิตร

(6) นำไปไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนถึงจุดยุติที่ค่าพีเอช 8.1 ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และหาค่าเฉลี่ยปริมาณสารละลายด่างที่ใช้ นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาตรกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ในรูปกรดซิตริกต่อ 100 กรัมของเนื้อลำไย โดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานดังนี้

1 มิลลิลิตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ทำปฏิกิริยาสมมูลพอดีกับกรดซิตริก 0.007 กรัม

สารละลายน้ำลำไย 100 มิลลิลิตร เจือจางมาจากเนื้อลำไย 10 กรัม ดังนั้นสารละลายน้ำลำไย 10 มิลลิลิตร เจือจางมาจากเนื้อลำไย 1 กรัม

ปริมาณกรดทั้งหมด (%) = ปริมาตร NaOH ที่ใช้ (ml)×ความเข้มข้น NaOH (N) 0.007× 100
(ในรูปกรดซิตริก)

**3.4.2 การวิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่าง (pH)** (AOAC, 2000.): Method 920.149

**วิธีวิเคราะห์**

ชั่งตัวอย่างเนื้อลำไยอบแห้งประมาณ 20 กรัม แช่ในน้ำกลั่นประมาณ 40 มิลลิลิตร (เป็นเวลาประมาณ 30 นาที หรือจนเนื้อลำไยอบแห้งนิ่ม) จากนั้นปั่นตัวอย่างเนื้อลำไยอบแห้งให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นนำมาวัดด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) ซึ่งมีการปรับค่ามาตรฐานในการวัดแต่ละตัวอย่างด้วยสารละลายมาตรฐานที่มีค่าพีเอช เท่ากับ 7.01 และ 4.01 ตามลำดับ ทำการวัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (Total Soluble Solids, %)** โดยใช้ Hand refractometer ตามวิธี (AOAC, 2000.): Method 970.21

**วิธีวิเคราะห์**

ชั่งตัวอย่างเนื้อลำไยอบแห้งประมาณ 20 กรัม แช่ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร (เป็นเวลาประมาณ 30 นาที หรือจนเนื้อลำไยอบแห้งนิ่ม) จากนั้นปั่นตัวอย่างเนื้อลำไยอบแห้งให้เป็นเนื้อเดียวกัน กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วนำมาวัดด้วยเครื่องวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (Hand refractometer) ซึ่งมีสเกลวัดค่าได้ระหว่าง 0-32% ปรับเทียบมาตรฐานโดยใช้น้ำกลั่นปรับให้อ่านค่าได้ 0 ก่อนการใช้วัดตัวอย่างทุกครั้ง ค่าที่อ่านได้มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ ซึ่งแต่ละตัวอย่างจะทำการวัด 2 ซ้ำ ค่าที่อ่านได้นำมาคูณด้วย 3 จึงเป็นค่าปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (รัตนาและอัจฉรา, 2542)

**3.4.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Lane and Eynon** (AOAC, 2000)

**3.4.4.1 สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเคมี**

(1) สารละลาย Carrez No.1: เตรียมโดยละลายซิงค์แอซีเทต ("Baker" Zinc acetate dehydrate, AR Grade, J.T. Baker, U.S.A.) จำนวน 21.9 กรัม ในน้ำกลั่นที่มีกรดแอซีติก ("Merck" Acetic acid glacial, AR Grade, E. Merck, Germany) จำนวน 3 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

(2) สารละลาย Carrez No.2: เตรียมโดยละลายโพแทสเซียมเฟอโรไซยาไนด์ ("Ajax Finechem" Potassium ferrocyanide, AR Grade, Asia Pecific Specialty, Australia) จำนวน 10.6 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

(3) สารละลาย Fehling No.1 : เตรียมโดยละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ("Baker" Copper sulphate, AR Grade, J.T. Baker, U.S.A.) จำนวน 69.278 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(4) สารละลาย Fehling No.2 : เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 100 กรัม และโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต ("Baker" Potassium sodium tartrate, AR Grade, J.T. Baker, U.S.A.) จำนวน 346 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

(5) สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6.34 นอร์มัล : เตรียมโดยตวงสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ("Merck" Hydrochloric Acid, AR Grade, E. Merck, Germany) จำนวน 564.33 มิลลิลิตร ค่อยๆ รินกรดลงในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

(6) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มัล : เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 200 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ต้มไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกไป และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

(7) สารละลายเมทิลีนบลูอินดิเคเตอร์ความเข้มข้น 1% : เตรียมโดยละลายเมทิลีนบลู ("Merck" Methylene blue, AR Grade, E. Merck, Germany) จำนวน 1 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

**วิธีวิเคราะห์**

**การเตรียมตัวอย่างลำไย**

(1) ชั่งตัวอย่างเนื้อลำไยอบแห้ง 5 กรัม (ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างอาหารด้วย) เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อยเพื่อที่จะได้ปั่นตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน

(2) เติมสารละลาย Clearing agent (Carrez I และ Carrez II ลงไปอย่างละ 5 มิลลิลิตร) เขย่าให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน ประมาณ 20-30 นาที

(3) กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman No.4) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนอินเวอร์ชั่น ($D_1$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

### 3.4.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนการทำอินเวอร์ชัน ($D_1$)

**วิธีวิเคราะห์**

(1) นำสารละลายที่กรองได้ใส่ในบิวเรต ไล่ฟองอากาศ โดยเฉพาะตรงส่วนปลายแท่งแก้วให้หมด

(2) ปิเปตต์สารละลาย Fehling's A และ Fehling's B อย่างละ 5 มิลลิลิตร ใส่ใน ฟลาส์คขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่แท่งแม่เหล็กลงไป เพื่อป้องกันการเดือดล้นออกมา

(3) นำไปต้มด้วยเครื่องกวนผสมด้วยแม่เหล็กไฟฟ้าจนเดือด หยดสารละลายเมทีลีนบลูลงไป 1–2 หยด ไทเทรตจนสีฟ้าจางหายไปหมด เหลือตะกอนสีส้มแดง อยู่ที่ก้นฟลาส์ค ทำการไทเทรตตัวอย่างละ 3 ครั้ง นำปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการไทเทรตมาหาค่าเฉลี่ย แล้วนำมาคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนอินเวอร์ชัน ($D_1$)

(4) นำปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ได้ ไปหาปริมาณน้ำตาลในรูปของน้ำตาลอินเวอร์ต (invert sugar) (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) จากตารางคำนวณหาเปอร์เซ็นต์น้ำตาลรีดิวซ์ก่อนอินเวอร์ชัน ($D_1$) ภาคผนวก ง

$$(D_1) = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาล (Sugar content) (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) x V}}{1000 \times W \times D}$$

V = ปริมาตรสุดท้าย (volume made up) (มิลลิลิตร)
W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)
D = ระดับความเจือจาง (Dilution factor)

**หมายเหตุ:**

(1) ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการไทเทรตกับสารละลายผสม Fehling จะต้องอยู่ในช่วง 15-50 มิลลิลิตร เท่านั้น

(2) ถ้าปริมาตรที่ใช้ไทเทรตน้อยกว่า 15 มิลลิลิตร แสดงว่าเตรียมสารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นเกินไป ต้องเจือจางสารละลายตัวอย่างลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(3) ถ้าปริมาตรที่ใช้ไทเทรตมากกว่า 50 มิลลิลิตร แสดงว่าเตรียมสารละลายตัวอย่างเจือจางเกินไป ต้องเตรียมตัวอย่างใหม่ให้มีความเข้มข้นมากกว่าเดิม

### 3.4.4.3 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังการทำอินเวอร์ชัน ($D_2$)

**วิธีวิเคราะห์**

(1) นำสารละลายตัวอย่างที่เหลือจากการหาน้ำตาลก่อนอินเวอร์ชัน (หรืออาจเตรียมใหม่ก็ได้) ทำการตกตะกอนให้ใสโดยใช้ Clearing agent ก่อนปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

(2) ปิเปตต์สารละลายตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6.34 นอร์มัล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว ปรับให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มัล ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นไทเทรตเช่นเดียวกับตอนแรก ทำซ้ำ 3 ครั้ง

(3) นำค่าที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลในรูปน้ำตาลอินเวอร์ตจากตารางคำนวณหาปริมาณน้ำตาลในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ภายหลังอินเวอร์ชัน ($D_2$) ซึ่งค่าที่ได้จะเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในตัวอย่างอาหาร รวมกับน้ำตาล อินเวอร์ต

(4) นำค่าปริมาณน้ำตาลที่ได้ (ทั้งค่า $D_1$ และ $D_2$) มาคำนวณหาปริมาณน้ำตาลดังนี้

**วิธีการคำนวณ**

น้ำตาลซูโครส (S,%) = $(D_2-D_1) \times 0.95$

น้ำตาลทั้งหมด (%) = $D_1+S$

เมื่อ $D_1$ = ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดก่อนทำอินเวอร์ชัน (%)

$D_2$ = ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดหลังทำอินเวอร์ชัน (%)

S = ปริมาณน้ำตาลซูโครส (%)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (Moisture Content)** (AOAC, 2000.): Method 934.06

**วิธีวิเคราะห์**

ชั่งตัวอย่างเนื้อลำไยอบแห้งที่ปั่นละเอียดประมาณ 3 กรัม (ชั่งให้ทราบน้ำหนักแน่นอน) เกลี่ยใส่ในจานโลหะที่ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนักมาก่อนแล้ว นำไปอบในตู้อบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 70±1 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน ≤100 มิลลิเมตรปรอท (13.3 กิโลพาสคาล) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบมาทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก อบซ้ำจนน้ำหนักคงที่ โดยน้ำหนักที่ชั่งได้ไม่ควรต่างจากครั้งแรกเกิน 0.002 กรัม คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น

**วิธีการคำนวณ**

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{(W_2 - W_3)x100}{W_2 - W_1}$$

เมื่อ $W_1$ = น้ำหนักของจานโลหะ (กรัม)

$W_2$ = น้ำหนักของจานโลหะ+น้ำหนักเนื้อลำไยก่อนอบ (กรัม)

$W_3$ = น้ำหนักของจานโลหะ+น้ำหนักเนื้อลำไยหลังอบ (กรัม)

**3.4.6 การวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์** (AOAC, 1990)

**หลักการวิเคราะห์**

การวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ในอาหาร โดยการต้มตัวอย่างอาหารแบบรีฟลักซ์กับสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (กรดเกลือ) เข้มข้น เพื่อเปลี่ยนซัลไฟต์ให้เป็นก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์หลังจากนั้นใช้ก๊าซไนโตรเจนพ่นลงไป ให้ปลายท่ออยู่ใต้ผิวของสารละลายที่ต้ม เพื่อไล่ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ซึ่งจะกลั่นตัวรวมกับน้ำผ่านเครื่องควบแน่น (condenser) ที่เย็นลงไปในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะถูกออกซิไดซ์เป็นกรดซัลฟิวริก (กรดกำมะถัน) ไทเทรตหาปริมาณกรดทั้งหมดที่เกิดขึ้นด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐานความเข้มข้น 0.01 นอร์มัล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเคมี**

(1) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.01 นอร์มัล ที่ผ่านการหาความเข้มข้นที่ถูกต้องโดยการไทเทรตกับสารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต

(2) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3% : เตรียมโดยตวงไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 30% (Hydrogen peroxide, AR Grade, E. Merck, Germany) ($H_2O_2$) มา 3 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 30 มิลลิลิตร เติมสารละลายเมทิลเรดลงไป 3 หยด แล้วไทเทรตให้เป็นสีเหลืองด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.01 นอร์มัล ก่อนนำไปใช้

(3) สารละลายบรอมโฟฟีนอลบลูอินดิเคเตอร์ 0.1% : เตรียมโดยชั่งบรอมโฟฟีนอลบลู 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

(4) ก๊าซไนโตรเจนที่มีความบริสุทธิ์สูง ดังแสดงในรูปที่ 3.1

**วิธีวิเคราะห์**

(1) ปล่อยน้ำเย็นไหลผ่านเครื่องควบแน่น (condenser)

(2) เติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3% ลงไปในฟลาส์ค G 25 มิลลิลิตร และ 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดดักก๊าซ H

(3) ชั่งตัวอย่างเนื้อลำไยอบแห้งมา 50 กรัม บดหรือปั่นให้ละเอียดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วเทตัวอย่างลงใน ฟลาส์ค B โดยผ่านทางท่อ A ที่ก๊าซผ่านเข้ามา และล้างอาหารที่ค้างในท่อ A ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 300 มิลลิลิตร

(4) ปิดท่อ A ทันที และต้องแน่ใจว่าทุกส่วนปิดสนิทแน่นดี ไม่รั่ว

(5) ฟลาส์ค B วางอยู่บนเตาไฟฟ้าแมนเทิล (heating mantle)

(6) เอาท่อ A ออกแล้วเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จำนวน 20 มิลลิลิตร ลงไปช้าๆ จนหมด ใส่ท่อ A ตามเดิม ให้สังเกตว่ามีฟองอากาศเข้าในขวด B หรือไม่ ถ้ามีแสดงว่าท่อเชื่อมไม่สนิท

(7) ปล่อยก๊าซไนโตรเจนเข้าไปในท่อ Aโดยให้มีอัตราการไหล 15-20 ฟองต่อนาที

(8) เร่งไฟปล่อยให้เดือดภายใน 5 นาที แล้วลดไฟลงให้เดือดช้าๆ ประมาณ 1 ชั่วโมง

(9) เมื่อครบกำหนด ปล่อยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในฟลาส์ค H ลงสู่ฟลาส์ค G รวมกัน และหยดบรอมโฟฟีนอลบลู 1-2 หยด นำไปไทเทรตด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.01 นอร์มัล จนได้สีฟ้าอ่อนบันทึกปริมาตรของด่างที่ใช้

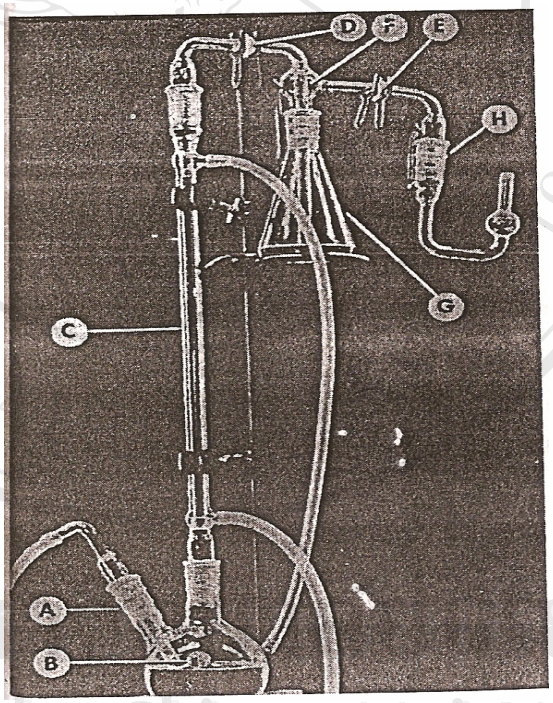
**วิธีการคำนวณ**

$$\text{ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (มิลลิกรัม/กิโลกรัม; ppm)} = \frac{32.03 \times V \times N \times 1000}{W}$$

เมื่อ V = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (มิลลิลิตร) ที่ใช้

N = ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์มัล)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)




**รูปที่3.1** .อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ซัลเฟอร์ไดออกไซด์

(ที่มา: AOAC, 1990)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.5 การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์** (BAM, 2001)

**3.5.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ**

(1) เครื่องตีป่นตัวอย่าง (Laboratory blender stomacher, Seward chemical 400, England)

(2) ถุงตีบด (stomacher bag)

(3) ขวดดูแรน (Duran bottle) ขนาด 100, 250, 500, 1000 มิลลิลิตรที่ทนต่อสภาวะการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

(4) หลอดทดลองชนิดฝาเกลียว ขนาด 13x100 มิลลิลิตร (test tube, Pyrex)

(5) หลอดทดลองชนิดฝาปิดหรือฝาเกลียวพลาสติก ขนาด 16x150 มิลลิลิตร พร้อมหลอดดักก๊าซ (Durham tube)

(6) ปิเปตต์ชนิดเกรทดูเอทเตท (graduated pipette) ขนาด 1.0 และ 10.0 มิลลิลิตร (ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2–3 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปใช้)

(7) จานเพาะเชื้อ (petri-dish) ขนาด 15x100 มิลลิเมตร (ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2–3 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปใช้)

(8) ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)

(9) แท่งแก้วแบบโค้งสำหรับทำสเปรดเพลท (bent glass rod)

(10) อุปกรณ์ที่ใช้ในการถ่าย (หยิบจับ) ตัวอย่าง เช่น มีด กรรไกร ปากคีบ (forceps) ช้อนตักสาร (spatulas) และอุปกรณ์ต่างๆ ต้องนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนใช้งาน

(11) เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Balance Dielhemim: HF-3000G, Switzerland)

(12) เครื่องเขย่า (Vertex, Scientific Industries: G-560E, U.S.A.)

(13) เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave, Gallenkamp, England)

(14) ตู้บ่ม (incubator) อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส (Gallenkamp, England)

(15) อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, Gallenkamp, England)

(16) เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้า (Hot plate and Magnetic stirrer, Whatman: HPMS, England)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(17) เตาไมโครเวฟ (Microwave oven, National: NN-K652, Japan)

(18) เครื่องนับจำนวนโคโลนีพื้นสีดำ (Colony counter, dark-field)

**3.5.2 การตรวจนับแอโรบิกแบคทีเรีย (Enumeration of Aerobic Plate Count; Conventional Plate Count Method)** (BAM, 2001)

**3.5.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด**

**(1) สารละลายบัฟเฟอร์เพปโทนความเข้มข้น 0.1%**

| | | |
|---|---|---|
| เพปโทน (Peptone, AR grade, E. Merck, Germany) | 1.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น (distilled water) | 1,000.0 | มิลลิลิตร |

ละลายเพปโทนในน้ำกลั่น โดยใช้เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้า (hot plate and magnetic stirrer) จนละลายดี ปิเปตต์ใส่ในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียว 9.3 มิลลิลิตรต่อหลอด (สำหรับใช้ในการเจือจางตัวอย่าง) หรือตวงใส่ขวดดูแรนขนาด 500 หรือ 1,000 มิลลิลิตร (สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่าง)นำไปฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

**(2) อาหารวุ้นแข็งเพลท เคาท์ (Plate count agar)**

| | | |
|---|---|---|
| อาหารเพลท เคาท์ (Plate count agar, E Merck; Germany) | 23.5 | กรัม |
| น้ำกลั่น (distilled water) | 1,000.0 | มิลลิลิตร |

ชั่งอาหารสำเร็จรูปเพลทเคาท์ตามปริมาตรที่จะเตรียมเติมน้ำกลั่น นำไปต้มระหว่างต้มต้องมีการคนบ่อยๆ เพื่อไม่ให้วุ้นติดก้นภาชนะ ต้มจนอาหารละลายดี แล้วแบ่งใส่ขวดดูแรน นำไปฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อสุดท้าย (final pH) ที่เตรียมได้ควรเท่ากับ 7.0±0.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**วิธีวิเคราะห์**

**(1) การเตรียมตัวอย่าง**

(1.1) ใช้มีดและปากคีบที่ทำให้ปราศจากเชื้อ (โดยการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) ตัดตัวอย่างเนื้อลำไยอบแห้งจากส่วนต่างๆ หลายๆ แห่งมาผสมรวมกัน ชั่งน้ำหนักให้ได้ 25 กรัม ใส่ในถุงตีป่นที่มีสารละลาย 0.1% บัฟเฟอร์เพปโทนปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมอยู่ นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นอาหารเป็นเวลา 2 นาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:10 ($10^{-1}$)

(1.2) เขย่าให้อาหารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ปิเปตต์ดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1:10 ($10^{-1}$) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เพปโทน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า จะได้ตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1:100 ($10^{-2}$)

(1.3) ทำให้มีความเจือจาง 1:1000 ($10^{-3}$) และทำการเจือจางต่อๆ ไปด้วยวิธีเดียวกัน จนมีความเจือจางถึง 1:1000000 ($10^{-6}$)

**(2) การใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ**

(2.1) ใช้ปิเปตต์ขนาด 1 มิลลิลิตร ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ ดูดสารละลายของตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจางต่างๆ ลงในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร ความเจือจางละ 2 จาน

(2.2) เทอาหารเพลตเคานต์ที่กำลังหลอมเหลว (อุณหภูมิไม่ควรสูงเกิน 48 องศาเซลเซียส) ลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่างโดยใส่ลงไปในจานๆ ละประมาณ 15–20 มิลลิลิตร ให้เสร็จภายในเวลา 15 นาที เริ่มจากความเจือจางน้อยที่สุด

(2.3) ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันดีโดยเขย่าไปข้างหน้าและหลัง 5 ครั้ง เขย่าไปทางซ้ายและขวา 5 ครั้ง เขย่าให้หมุนตามเข็มนาฬิกา 5 ครั้ง และเขย่าให้ทวนเข็มนาฬิกา 5 ครั้งในขณะที่เขย่าควรระมัดระวังไม่ให้อาหารเลอะติดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วางไว้จนอาหารแข็งตัวคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อลง

(2.4) ทำตัวอย่างควบคุม โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์เพปโทน 1 มิลลิลิตร แทนสารละลายของตัวอย่างอาหาร รอให้อาหารแข็งตัวแล้วจึงคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**(3) การบ่มเชื้อ**

บ่มจานอาหารที่เตรียมไว้เสร็จเรียบร้อยแล้วที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยคว่ำจานเลี้ยงเชื้อลง และควรวางซ้อนกันประมาณ 5 ชั้น บรรจุในถุงพลาสติก

**(4) การตรวจนับจำนวนโคโลนีและการรายงานผล**

หลังบ่มเชื้อตามกำหนดเวลาแล้ว ตรวจนับโคโลนีบนจานอาหารเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30–300 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากทั้ง 2 จานเพาะเชื้อ รายงานผลการตรวจนับว่ามีจำนวน แอโรบิกแบคทีเรีย (aerobic bacteria) ในรูปโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม (cfu/g)

**3.5.2.2 หลักการนับจำนวนโคโลนี**

**(1) ถ้าจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นมีจำนวนอยู่ระหว่าง 30–300 โคโลนี**

(1.1) ถ้า 1 ความเจือจางมีจำนวนโคโลนี 30–300 ให้นับจำนวนโคโลนีได้เลย แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย รายงานว่า “มีจำนวนโคโลนีเท่ากับ $Yx10^{x}$ cfu/g” (เมื่อ Y = จำนวนโคโลนีที่นับได้เฉลี่ย / ทศนิยม 1 ตำแหน่ง, x = ความเจือจางของจานที่ตรวจนับ)

(1.2) ถ้ามี 2 ความเจือจางที่มีจำนวนโคโลนี 30–300 ให้ทำการนับจำนวนโคโลนีแต่ละความเจือจางแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยอีกครั้งหนึ่ง รายงานผลการนับว่า “มีจำนวนโคโลนีเท่ากับ $Yx10^{x}$ cfu/g” (เมื่อ Y = จำนวนโคโลนีที่นับได้เฉลี่ย / ทศนิยม 1 ตำแหน่ง, x = ค่าเลขยกกำลัง) เช่น ที่ความเข้มข้น $10^{-3}$ นับได้ 260 ($2.6x10^{5}$) และที่ความเข้มข้น $10^{-4}$ นับได้ 44 โคโลนี ($4.4x10^{5}$) จำนวนโคโลนีเฉลี่ยจากสองความเจือจางเท่ากับ $3.5x10^{5}$ (350,000) ให้รายงานว่ามีจำนวนโคโลนีเท่ากับ $3.5x10^{5}$ โคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม

(1.3) ถ้ามี 2 ความเจือจางที่มีจำนวนโคโลนี 30–300 โดยที่ความเจือจางหนึ่งมีจำนวนโคโลนีเฉลี่ยมากกว่าเป็น 2 เท่าของอีกความเจือจางหนึ่ง ให้รายงานผลการนับเฉพาะจำนวนโคโลนีที่มีจำนวนน้อยกว่าเท่านั้น ตัวอย่างที่ความเจือจาง $10^{-2}$ นับได้ 150 โคโลนี (เท่ากับ $1.5x10^{4}$) และที่ความเจือจาง $10^{-3}$ นับได้ 310 โคโลนี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(เท่ากับ $3.1x10^4$) ให้รายงานผลการตรวจนับว่ามีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ $1.5x10^4$ โคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม

**(2) ถ้าทุกความเจือจางมีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 30**

ให้รายงานผลการตรวจนับโคโลนีที่ความเจือจางต่ำสุดโดยรายงานว่า "มีจำนวนโคโลนีเท่ากับ $1x10^x$ (โดยประมาณ)" เมื่อ x = ความเจือจางต่ำสุดที่ทำการตรวจนับ เช่น ที่ความเจือจาง $10^{-2}$ นับได้ 12 โคโลนี ($1.2x10^3$) และที่ความเจือจาง $10^{-3}$ นับได้ 3 โคโลนี ($3x10^3$) ให้รายงานผลการตรวจนับว่ามีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ $1.2x10^3$ โคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม (โดยประมาณ)

**(3) ถ้าทุกความเจือจางไม่มีโคโลนีขึ้นเลย**

ให้รายงานว่า "มีจำนวนน้อยกว่า $1x10^x$ (โดยประมาณ)" เมื่อ x = ความเจือจางต่ำสุดที่ทำการตรวจนับ เช่น ที่ความเจือจาง $10^{-2}$ และ $10^{-3}$ ไม่มีจำนวนโคโลนีขึ้นเลย ให้รายงานผลการตรวจนับว่ามีจำนวนแบคทีเรียน้อยกว่า $1x10^2$ โคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม (โดยประมาณ)

**(4) ถ้ามีจำนวนโคโลนีมากกว่า 300 โคโลนี**

(4.1) ถ้าจำนวนโคโลนีเกิน 300 โคโลนีไม่มากนัก ให้นับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่พบในความเจือจางสูงสุด คำนวณเป็นค่าเฉลี่ยออกมาและรายงานผลเป็นค่าโดยประมาณแบคทีเรียทั้งหมด

(4.2) ถ้าจำนวนโคโลนีเกิน 300 โคโลนีมาก (เกิน 10 โคโลนีต่อพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร) ให้นับจำนวนโคโลนีที่พบในพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร (โดยแบ่งเป็นช่องขนาด 1 ตารางเซนติเมตร แล้วนับจำนวนโคโลนีที่อยู่ในช่องนั้นจำนวน 13 ช่อง แบบสุ่ม) รวมจำนวนโคโลนีโดยประมาณ (โคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม) ของตัวอย่างนั้น

(4.3) ถ้าจำนวนโคโลนีเกิน 300 โคโลนีมากจนไม่สามารถนับได้ ให้รายงานว่า "TNTC" (Too Numerous To Count) และต้องเตรียมตัวอย่างให้มีระดับความเจือจางที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ครั้งต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

### 3.5.3 การตรวจนับปริมาณยีสต์และรา (Enumeration of Yeasts and Molds; Dilution Plating Technique) (BAM, 2001)

#### 3.5.3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับตรวจนับยีสต์และรา

**(1) เตรียมอาหารแข็งไดคลอแรนโรสเบนกอลคลอแรมฟีนีคอล (Dichloran rose bengalchloramphenicol (DRBC) agar)**

| | | |
|---|---|---|
| กลูโคส (Glucose, E Merck; Germany) | 10.0 | กรัม |
| แบคเทอรีโอโลจิคอล เพปโทน (Bacteriological peptone) | 5.0 | กรัม |
| โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$,E Merck; Germany) | 1.0 | กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$, E Merck; Germany) | 0.5 | กรัม |
| สารละลายโรสเบนกอล (Rose Begal) 5% (w/v) | | |
| ละลายในน้ำ | 0.5 | มิลลิลิตร |
| สารละลายไดคลอแรน (2,6–dichloro-4-nitroaniline) 0.2 %(w/v) | | |
| ละลายในเอทานอล | 1.0 | มิลลิลิตร |
| คลอแรมฟีนิคอล (Chloramphenicol) | 1.0 | กรัม |
| วุ้น (Agar) | 0.1 | กรัม |
| น้ำกลั่น (distilled water) | 1,000.0 | มิลลิลิตร |

ชั่งสารใส่น้ำกลั่น นำไปต้มจนส่วนผสมและวุ้นละลายใสเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ขวดดูแรนประมาณ ¾ ของขวด นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ค่าพีเอชสุดท้าย (final pH) ควรมีค่าเท่ากับ 5.6

**หมายเหตุ:** กำหนดให้อุณหภูมิของอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ใช้เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนเทและอุณหภูมิของอาหารขณะเทลงจานอาหารอยู่ที่ 45±1 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**วิธีวิเคราะห์**

**(1) การเตรียมตัวอย่าง**

(1.1) ใช้มีดและปากคีบที่ทำให้ปราศจากเชื้อ (โดยการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) ตัดตัวอย่างเนื้อลำไยอบแห้งจากส่วนต่างๆ หลายๆ แห่งมาผสมรวมกัน ชั่งน้ำหนักให้ได้ 25 กรัม ใส่ในถุงตีป่นที่มีสารละลาย 0.1% บัฟเฟอร์เพปโทน 225 มิลลิลิตร ผสมอยู่ นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นอาหาร เป็นเวลา 2 นาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:10 ($10^{-1}$)

(1.2) เขย่าให้อาหารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ปิเปตต์ดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1:10 ($10^{-1}$) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ เพปโทน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า จะได้ตัวอย่างอาหารอาหารที่เจือจาง 1:100 ($10^{-2}$)

(1.3) ทำให้มีความเจือจาง 1:1000 ($10^{-3}$) และความเจือจางต่อๆ ไปด้วยวิธีเดียวกันจนถึงความเจือจาง 1:1000000 ($10^{-6}$)

**(2) การทำสเปรดเพลท (Spred-Plate method) สำหรับตรวจนับเชื้อยีสต์และราด้วยอาหารแข็ง DRBC** (BAM, 2001)

(2.1) เทอาหารเลี้ยงเชื้อ DRBC ลงในจานเพาะเชื้อ ประมาณ 15–20 มิลลิลิตร ปล่อยไว้ให้อาหารวุ้นแข็งตัว ให้ทำกลุ่มละ 3 จาน อบผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้แห้งในตู้บ่มอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

(2.2) ปิเปตต์สารละลายอาหารที่มีความเจือจางต่างๆ จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงตรงกลางของผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ DRBC ความเจือจางละ 2 จาน

(2.3) ใช้แท่งแก้วแบบโค้ง (bent glass rod) ที่ฆ่าเชื้อโดยการฉีดพ่นด้วยแอลกอฮอล์และลนไฟแล้ว เกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ระวังอย่าให้โดนขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

(2.4) วางหงายจานเพาะเชื้อไว้นานประมาณ 15 นาที เพื่อให้สารละลายอาหารซึมเข้าไปในวุ้น แล้วจึงคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**(3) การบ่มเชื้อ**

บ่มจานอาหารที่เตรียมไว้เสร็จเรียบร้อยแล้วที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดยคว่ำจานเลี้ยงเชื้อลง และควรวางซ้อนกันประมาณ 3 ชั้น บรรจุในถุงพลาสติก

**(4) การตรวจนับจำนวนโคโลนีและการรายงานผล**

หลังบ่มเชื้อตามกำหนดเวลาแล้ว ตรวจนับโคโลนีบนจานอาหารเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30–300 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากทั้ง 2 จานเพาะเชื้อ รายงานผลการตรวจนับว่ามีจำนวนเชื้อยีสต์และรา ในรูปโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม (cfu/g)

**3.5.4 การตรวจหาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรียทั้งหมด** (BAM, 2001)

**3.5.4.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับตรวจหาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรียทั้งหมด**

**(1) อาหารเหลวลอริล ซัลเฟต (Lauryl Sulfate Broth)**

| | | |
|---|---|---|
| อาหารลอริลซัลเฟต (Lauryl Sulfate Broth) | 35.6 | กรัม |
| น้ำกลั่น (distilled water) | 1,000.0 | มิลลิลิตร |

ชั่งสารมาผสมน้ำกลั่นคนให้ละลาย แบ่งใส่หลอด และใส่หลอดดักก๊าซลงไป ปิดฝา นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (ควรมีค่าพีเอช สุดท้าย 6.8±0.2)

**(2) อาหารเหลวบริลเลียนต์กรีนแล็กโทสไบล์บรอท (Brilliant Green Lactose Bile Broth)**

| | | |
|---|---|---|
| อาหารบริลเลียนต์กรีนแล็กโทสไบล์ (BGLB, E Merck; Germany) | 40.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น (distilled water) | 1,000.0 | มิลลิลิตร |

ชั่งสารมาผสมน้ำกลั่นคนให้ละลาย แบ่งใส่หลอด และใส่หลอดดักก๊าซลงไป ปิดฝา นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (ควรมีค่าพีเอช สุดท้าย 7.2±0.1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**(3) เตรียมอาหารแข็งซิมมอน ซิเตรต (Simmon Citrate Agar)**

| | | |
|---|---|---|
| อาหารซิมมอนซิเตรต (Simmon Citrate Agar) | 24.3 | กรัม |
| น้ำกลั่น (distilled water) | 1,000.0 | มิลลิลิตร |

ชั่งสารผสมกับน้ำกลั่น นำไปต้มระหว่างต้มต้องคนบ่อยๆ เพื่อไม่ให้วุ้นติดก้นภาชนะพอเดือดแบ่งใส่หลอด ปิดฝาหลอด นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วางเอียง (slant)

**(4) เตรียมน้ำทริพโทน (Tryptone water)**

| | | |
|---|---|---|
| ทริพโทน (Tryptone) | 3.0 | กรัม |
| โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride, E Merck; Germany) | 1.5 | กรัม |
| น้ำกลั่น (distilled water) | 1,000.0 | มิลลิลิตร |

ชั่งสารผสมน้ำคนให้ละลาย แบ่งใส่หลอด ปิดฝาหลอด นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

**วิธีวิเคราะห์**

**(1) การเตรียมตัวอย่าง**

(1.1) ใช้มีดและปากคีบที่ทำให้ปราศจากเชื้อ (โดยการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) ตัดตัวอย่างเนื้อลำไยอบแห้งจากส่วนต่างๆ หลายๆ แห่งมาผสมรวมกัน ชั่งน้ำหนักให้ได้ 25 กรัม ใส่ในถุงตีป่นที่มีสารละลาย 0.1% บัฟเฟอร์เพปโทน 225 มิลลิลิตร ผสมอยู่ นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นอาหาร เป็นเวลา 2 นาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:10 ($10^{-1}$)

(1.2) เขย่าให้อาหารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ปิเปตต์ดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1:10 ($10^{1}$) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เพปโทน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า จะได้ตัวอย่างอาหารอาหารที่เจือจาง 1:100 ($10^{-2}$) ทำให้มีความเจือจางจนถึงความเจือจาง 1:1000 ($10^{-3}$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**(2) การทดสอบหาโคลิฟอร์มแบคทีเรียขั้นแรก (Presumptive test for coliform bacteria)**

(2.1) ปิเปตต์สารละลายของตัวอย่างอาหารแต่ละความเจือจางใส่ในหลอดอาหารเหลวลอริลซัลเฟตทริปโทส ระดับความเจือจางละ 3 หลอดๆ ละ 1 มิลลิลิตร (9 หลอดต่อหนึ่งตัวอย่าง / ไม่ควรใช้เวลาเกิน 15 นาที ในการทำแต่ละตัวอย่าง)

(2.2) นำหลอดอาหารทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยสังเกตการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซในหลอดอาหารแต่ละหลอด หลังจากบ่มครบ 24 ชั่วโมง และหากหลอดใดไม่เกิดก๊าซให้บ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง จึงนำมาตรวจผลอีกครั้ง

(2.3) บันทึกจำนวนหลอดที่เกิดก๊าซในแต่ละความเจือจาง นำไปเปรียบเทียบกับตารางเอ็มพีเอ็น รายงานผลเป็น เอ็มพีเอ็นของโคลิฟอร์ม (ขั้นแรก) ต่อกรัมของตัวอย่างอาหาร

**(3) การทดสอบยืนยันโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Confirm test for coliform bacteria)**

(3.1) ถ่ายเชื้อจากหลอดที่เกิดก๊าซในข้อ 2 (Presumptive test) แต่ละหลอดลงในอาหารเหลวบริลเลียนกรีนแลกโทสไบล์บรอท หลอดต่อหลอด จำนวน 1 ลูป (loopfull)

(3.2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48$\pm$2 ชั่วโมง โดยสังเกตการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซในหลอดอาหารแต่ละหลอด หลังจากบ่มครบ 48 ชั่วโมง

(3.3) บันทึกจำนวนหลอดที่เกิดก๊าซในแต่ละความเจือจาง นำไปเทียบกับตารางเอ็มพีเอ็นรายงานผลเป็นเอ็มพีเอ็นของโคลิฟอร์ม (ขั้นยืนยัน) ต่อกรัมของตัวอย่างอาหาร

**การคำนวณจำนวนโคโลนีและการรายงานผล**

หลังจากที่ทราบจำนวนหลอดที่เกิดก๊าซ (positive) ในแต่ละความเจือจางแล้ว นำไปเทียบกับตารางเอ็มพีเอ็นรายงานผลเป็นเอ็มพีเอ็นของโคลิฟอร์ม (ขั้นแรก) ต่อกรัมของตัวอย่างอาหาร

**ตัวอย่าง**: ถ้าจำนวนหลอดที่เกิดก๊าซที่ความเจือจาง $10^{-1}$ (0.1), $10^{-2}$ (0.01) และ $10^{-3}$ (0.001) เท่ากับ 3, 2 และ 1 หลอด ตามลำดับ จากการเปิดตารางเอ็มพีเอ็นได้ค่าเอ็มพีเอ็นต่อกรัม = 150 ให้รายงานผลการตรวจนับว่ามีค่า เอ็มพีเอ็น (MPN) = 150 Total coliform / g

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved