ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก
รูปน้ำแครอทก่อนและหลังการแปรรูป
และ
รูปสารสกัดแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Control HP400 HP600 HT9030 HT9060

รูป ก.1 น้ำแครอทก่อนและหลังการแปรรูปด้วยเทคนิคความดันสูงและความร้อน

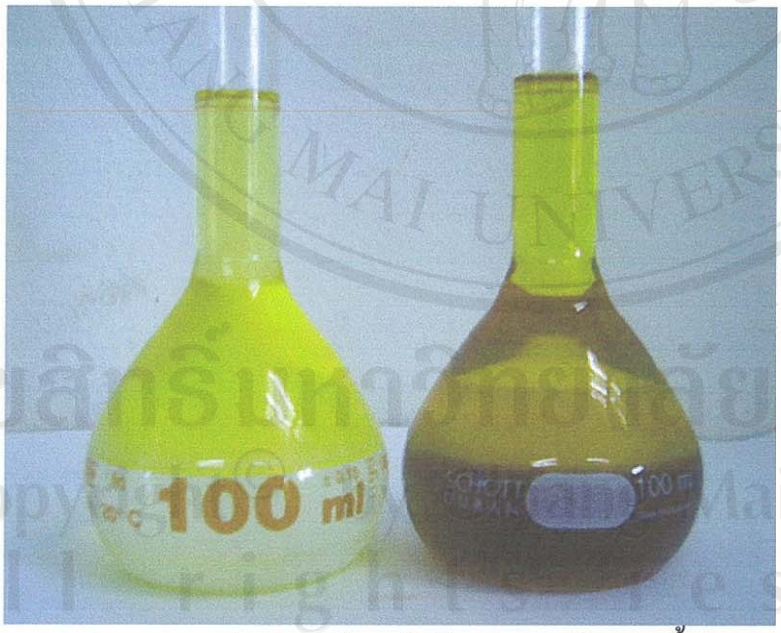
Control คือ น้ำแครอทก่อนแปรรูป

HP400 คือ น้ำแครอทแปรรูปด้วยเทคนิคความดันสูง 400 เมกกะปาสคาล 15 นาที

HP600 คือ น้ำแครอทแปรรูปด้วยเทคนิคความดันสูง 600 เมกกะปาสคาล 15 นาที

HT9030 คือ น้ำแครอทแปรรูปด้วยเทคนิคความร้อน 90 องศาเซลเซียส 30 วินาที

HT9060 คือ น้ำแครอทแปรรูปด้วยเทคนิคความร้อน 90 องศาเซลเซียส 60 วินาที



1. สารมาตรฐานแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีน 2. สารตัวอย่างน้ำแครอท

รูป ก.2 สารสกัดแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีนของสารมาตรฐานและตัวอย่างน้ำแครอท

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์คุณภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

การวัดสีระบบ Hunter ตามวิธีของ Minolta Co., Ltd.

การวัดสี ทำการวัดสีน้ำแครอทสด ด้วยเครื่องวัดสี (Minolta)

การใช้เครื่องวัดสี (Minolta) ก่อนใช้เครื่องทุกครั้งได้ปรับมาตรฐานของเครื่องวัดสีด้วยแผ่นเทียบสีมาตรฐานสีขาว นำน้ำแครอทบรรจุในภาชนะ จากนั้นนำหัววัดของเครื่องวัดสีจุ่มลงในน้ำแครอทแล้วทำการวัดสี บันทึกผลการทดลอง ทำการวัด 3 ซ้ำ โดยค่า L เป็นค่าความสว่าง (lightness) a เป็นค่าสีแดงและสีเขียว (redness/greenness) และ b เป็นค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (yellowness/blueness)

L คือ ค่าความสว่าง	มีค่าอยู่ในช่วง 0 ถึง 100
a คือ ค่าสีแดงและสีเขียว	เมื่อ a มีค่าบวก เป็นสีแดง
	เมื่อ a มีค่าลบ เป็นสีเขียว
b คือ ค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน	เมื่อ b มีค่าบวก เป็นสีเหลือง
	เมื่อ b มีค่าลบ เป็นสีน้ำเงิน

2. การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์และน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Lane and Eynon

การเตรียมสารเคมี

(1) สารละลาย Carrez No.1 เตรียมโดยละลายซิงอะซิเตต (Zinc acetate dehydrate AR Grade) จำนวน 21.9 กรัม ในน้ำกลั่นที่มีกรดอะซิตริก (Acetic acid glacial AR Grade) จำนวน 3 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

(2) สารละลาย Carrez No.2 เตรียมโดยละลายโพแทสเซียมเฟอโรไซยาไนด์ (Potassium ferrocyanide AR Grade) จำนวน 10.6 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

(3) สารละลาย Fehling No.1 เตรียมได้โดยละลายคอบเปอร์ซัลเฟต (Copper sulphate AR Grade) จำนวนน 69.278 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

(4) สารละลาย Fehling No.2 เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide NaOH AR Grade) จำนวน 100 กรัม และโซเดียมโพแทสเซียมตาเตรต (Sodium potassium

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

tartrate AR Grade) จำนวน 346 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

วิธีทำ

ชั่งตัวอย่างน้ำแครอท 50 กรัม เติม Clearing agent คือ สารละลาย Carrez No.1 และ No.2 ลงไปอย่างละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 เก็บสารละลายที่กรองได้ไว้ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลดังต่อไปนี้

- ***การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลก่อนการทำอินเวอร์ชัน***

นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่ในบิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร ไล่ฟองอากาศออกให้หมด ปิเปตสารละลาย Fehling No.1 และ No.2 อย่างละ 5 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปตั้งบนเครื่อง hot plate stirrer จนเดือด ไตเตรทกับสารละลายน้ำตาลตัวอย่างจนสีน้ำเงินจางลง หยดสารละลายเมทิลีนบลูลงไป 1 หยด ไตเตรทจนสีฟ้าหายไปหมด เหลือตะกอนสีส้มแดง จดปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ ถ้าปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้อยู่ในช่วง 15-50 มิลลิลิตร แสดงว่าสารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นเหมาะสม ทำการไตเตรทสารละลายตัวอย่างให้ได้ค่าที่ถูกต้องกับสารละลาย Fehling โดยปล่อยสารละลายน้ำตาลจากบิวเรตลงไปทันที โดยใช้ปริมาตรน้อยกว่าที่ใช้ในการไตเตรทครั้งแรกประมาณ 1-2 มิลลิลิตร ปล่อยให้เดือดนาน 2 นาที หยดสารละลายเมทีลีนบลู 1 หยด ไตเตรทจนสีฟ้าหายไปหมด เหลือตะกอนสีส้มแดง จดปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง นำปริมาตรสารละลายน้ำตาลที่ใช้มาหาค่าเฉลี่ย แล้วนำไปเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลในสารละลายตัวอย่างจากตารางมาตรฐาน

- ***การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลภายหลังการทำอินเวอร์ชัน***

ปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 50 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6.34 นอร์มัล ลงไป 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำไฮโดรไลซ์ใน water bath ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำมาทำให้เย็น แล้วปรับให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มัล แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายตัวอย่างนี้ใส่ลงในบิวเรต ทำการไตเตรทกับสารละลาย Fehling เช่นเดียวกับการหาปริมาณน้ำตาลก่อนอินเวอร์ชัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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

น้ำตาลทั้งหมด (%) = เปอร์เซ็นต์น้ำตาลซูโครส + D_1

เมื่อ D_1 = เปอร์เซ็นต์น้ำตาลก่อนการทำอินเวอร์ชั่น

D_2 = เปอร์เซ็นต์น้ำตาลภายหลังการทำอินเวอร์ชั่น

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีนในน้ำแครอทด้วยเทคนิค HPLC

ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC (2000) และ In house method; Kemin Health, USA

2.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีน

วิธีการ

(1) ชั่งสารมาตรฐานแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีน 0.002 กรัม ลงในบีกเกอร์ 50 มิลลิลิตร ละลายสารมาตรฐานด้วยสารละลายเคลื่อนที่ (Mobile phase) ประกอบด้วย Hexane : Dichloromethane : Methanol : Diisopropylethylamine ในอัตราส่วน 74.6:24.9:0.4:0.1 ตามลำดับ จำนวน 5 มิลลิลิตร

(2) ปรับปริมาตรสารละลายในข้อ 1 ให้ครบ 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรสีชาด้วยสารละลายเคลื่อนที่ (Mobile phase)

(3) ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายในข้อ2 จำนวน 25, 50, 100, 150, 200, 250 และ 375 ไมโครลิตร ใส่ในขวดไวออ (Vial) แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายเคลื่อนที่ (Mobile phase) ให้ครบ 1000 ไมโครลิตร (1 มิลลิลิตร)

(4) นำสารละลายในข้อ 4 มาฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้สภาวะในการทดลองดังต่อไปนี้

- สารละลายเคลื่อนที่ : Hexane : Dichloromethane : Methanol : Diisopropylethylamine ในอัตราส่วน 74.6:24.9:0.4:0.1
- ชนิดของคอลัมน์ : 250 mm x 4.6 mm nitrile bonded Waters Spherisorb column (5um particles) with a Rexchrom nitrile guard column
- อัตราเร็วของการชะ : 0.5 มิลลิลิตร/นาที
- ปริมาตรของสารที่ฉีด : 50 ไมโครลิตร
- ความยาวคลื่นในการตรวจวัด : 446 นาโนเมตร
- อุณหภูมิของคอลัมน์ : 25 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- เวลาในการวิเคราะห์ : 30 นาที

(5) หลังจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC แล้วจะได้โครมาโตแกรมแสดงพีคของสารแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีนมาตรฐาน

(6) นำค่าพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์ในของสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีนกับพื้นที่ใต้พีคที่อ่านได้ แล้วทำสมการเส้นตรงจากกราฟ

2.2.2 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีนจากตัวอย่างน้ำแครอท

วิธีการสกัด

ปีเปตตัวอย่างน้ำแครอท 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรสีชาขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายผสมของเฮกเซน เอทานอล อะซีโตน และโทลูอีนในอัตราส่วน 10:6:7:7 ตามลำดับ จำนวน 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 40% ในเมทานอล จำนวน 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำสารผสมในขวดปรับปริมาตรสีชาที่ได้ไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 56±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยให้ใส่หลอดแคปิลารีที่ปากขวด เพื่อทำการ Reflux เมื่อครบเวลาให้นำสารละลายที่ได้ไปทำให้เย็น โดยแช่อ่างน้ำเย็นเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติมเฮกเซน 30 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยสารละลายของโซเดียมซัลเฟต 10% ในน้ำกลั่น เขย่าสารผสมที่ได้ให้เข้ากัน แล้วเก็บสารผสมในขวดปรับปริมาตรสีชาไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแยกชั้นอย่างสมบูรณ์

วิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายในขวดปรับปริมาตรที่สีชาในชั้นบน 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดไวออสีชา (Vial) แล้วนำสารละลายในขวดไวออสีชาไประเหยตัวทำละลายภายใต้สภาวะของก๊าซไนโตรเจน หลังจากที่ตัวทำละลายระเหยออกไปจากขวดไวออสีชาหมดแล้ว ให้เติมสารละลายเคลื่อนที่ (Mobile phase) ประกอบด้วย Hexane : Dichloromethane : Methanol : Diisopropylethylamine ในอัตราส่วน 74.6:24.9:0.4:0.1 ตามลำดับ จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายที่ได้เข้าเครื่องโซนิเคทเป็นเวลา 1 นาที เพื่อการละลายอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง HPLC 50 ไมโครลิตร โดยทำกำหนดสภาวะของการทดลองดังต่อไปนี้

- สารละลายเคลื่อนที่ : Hexane : Dichloromethane : Methanol : Diisopropylethylamine ในอัตราส่วน 74.6:24.9:0.4:0.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ชนิดของคอลัมน์ : 250 mm x 4.6 mm nitrile bonded Waters Spherisorb column (5um particles) with a Rexchrom nitrile guard column
- อัตราเร็วของการชะ : 0.5 มิลลิลิตร/นาที
- ความยาวคลื่นในการตรวจวัด : 446 นาโนเมตร
- อุณหภูมิของคอลัมน์ : 25 องศาเซลเซียส
- เวลาในการวิเคราะห์ : 30 นาที

การคำนวณหาปริมาณแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีน

นำค่าพื้นที่พีคของแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีนมาตรฐานที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่เตรียมไว้ในขั้นตอนการสร้างกราฟมาตรฐาน มาคำนวณหาสูตรสมการเส้นตรงได้ ดังนี้

$$y = 1221.4x - 377.71$$

โดย y = พื้นที่พีคของแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีนมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

x = ปริมาณแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีนในตัวอย่าง (mg/l)

จากนั้นนำค่า y ที่ได้มา คำนวณหาปริมาณแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีนในตัวอย่างต่อไป

ปริมาณแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีนในตัวอย่างน้ำแครอท (mg/l)

$$= \frac{\text{ปริมาณแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีนที่เทียบจากกราฟมาตรฐาน x 50}}{10}$$

โดย 50 คือ ปริมาณสารละลายสกัดชั้นบน 50 มิลลิลิตร

10 คือ ปริมาณของตัวอย่างน้ำแครอทเท่ากับ 10 มิลลิลิตร

3. การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา

3.1 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) โดยวิธี Pour plate (AOAC, 2002)

การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

(1) สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้น 0.1% (Peptone AR Grade) ชั่งเปปโตน 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ขวดหรือหลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(2) อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (AR Grade) ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อมา 23.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส

วิธีทำ

(1) เตรียมตัวอย่างน้ำแครอท โดยนำตัวอย่างน้ำแครอทแช่เยือกแข็งที่บรรจุในถุง มาเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 40 นาที

(2) ใช้กรรไกรที่ฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ เปิดถุง แล้วชั่งตัวอย่างน้ำแครอท 25 กรัม ใส่ในถุงตีป่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 225 กรัม นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นจนตัวอย่างแตกละเอียดและผสมเป็นเนื้อเดียวกัน สารละลายที่ได้เป็นตัวอย่างที่เจือจาง 1 : 10 หรือ 10^{-1}

(3) ปิเปตตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าตัวอย่างให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ได้เป็นสารละลายตัวอย่างที่เจือจาง1:100 หรือ 10^{-2}

(4) นำตัวอย่างที่เจือจาง 1:100 มาเจือจางให้เป็น 10^{-3} , 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}... โดยทำเช่นเดียวกับข้อ 3

การตรวจนับจุลินทรีย์

ใช้ปิเปต(ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ) ปิเปตตัวอย่างอาหารเจือจางที่เตรียมไว้(10^{-1} , 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} ...) ลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร ระดับเจือจางละ 2 จาน โดยเริ่มดูดจากตัวอย่างอาหารที่เจือจางมากสุด จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar ที่หลอมเหลวลงในจานเพาะเชื้อผสมตัวอย่าง และอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน วางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากบ่มเชื้อได้ตามกำหนด ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเชื้อ โดยจำนวนจุลินทรีย์อยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี นำค่าเฉลี่ยจากทั้ง 2 จานเพาะเชื้อรายงานผลการตรวจนับว่ามี Mesophilic aerobic bacteria ในรูปจำนวนโคโลนีต่อน้ำแครอท 1 กรัม

3.2 การตรวจวิเคราะห์ Yeast & Mold โดยวิธี Pour plate (AOAC, 2002)

การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

(1) สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้น 0.1% (Peptone AR Grade) ชั่งเปปโตนมา 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ขวดหรือ หลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(2) อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (AR Grade) ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาใช้ต้องปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 3.5 โดยการเติมสารละลายกรดตาร์ตาริก ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 1.9 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

(1) ทำเจือจางตัวอย่างน้ำแครอท โดยชั่งตัวอย่างน้ำแครอท 25 กรัม ใส่ใน 0.1% Peptone water จำนวน 225 มล. นำเข้า stomacher นาน 30 วินาที จะได้สารละลายอาหารที่เจือจาง 10^{-1}

(2) ทำ pour plate ตัวอย่างน้ำแครอทที่เจือจางระดับ 10^{-1} , 10^{-2} จนถึง 10^{-5} ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Dichloran 18% glycerol (DG18) agar ความเข้มข้นละ 3 จาน

(3) บ่มที่ 25±2°ซ นาน 5 วัน ให้นับโคโลนีที่เกิดขึ้น

(4) คำนวณผลการทดลอง

3.3 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ Coliform และ *Escherichia coli* โดยวิธี MPN

3.3.1 วิเคราะห์เชื้อ Coliform

วิธีการทดลอง

(1) ทำเจือจางตัวอย่างน้ำแครอท โดยชั่งตัวอย่างน้ำแครอท 25 กรัม ใส่ใน phosphate buffer จำนวน 225 กรัม นำเข้า stomacherนาน 30 วินาที จะได้สารละลายอาหารที่เจือจาง 10^{-1}

(2) ทำเจือจางต่อที่ 10^{-2} และ 10^{-3} จากนั้นให้ปิเปตตัวอย่างน้ำแครอทที่เจือจางลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl trytose (LST) broth โดยใช้วิธี MPN-method ดังนี้

ชุดที่ 1 ปิเปตตัวอย่างอาหารที่เจือจางระดับ 10^{-1} จำนวน 1 มล. ลงในหลอดอาหาร Lauryl trytose (LST) broth จำนวน 3 หลอด

ชุดที่ 2 ปิเปตตัวอย่างอาหารที่เจือจางระดับ 10^{-2} จำนวน 1 มล. ลงในหลอดอาหาร Lauryl trytose (LST) broth จำนวน 3 หลอด

ชุดที่ 3 ปิเปตตัวอย่างอาหารที่เจือจางระดับ 10^{-3} จำนวน 1 มล. ลงในหลอดอาหาร Lauryl trytose (LST) broth จำนวน 3 หลอด

(3) บ่มที่ 35±2°ซ นาน 24-48 ชม. ตรวจสอบการเกิดฟองก๊าซ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(4) ใช้ห่วงถ่ายเชื้อจากอาหาร LST ที่เกิดฟองก๊าซใส่ลงในอาหาร BGLB (Brilliant Green Lactose Bile Broth) จำนวน 3 หลอด

(5) บ่มที่อุณหภูมิ 35±2°ซ นาน 24-48 ชม. สังเกตการเกิดฟองก๊าซ ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นนำไปทดสอบยืนยัน (Confirm test) ต่อ

(6) นำหลอดที่มีก๊าซเกิดขึ้นมาเขย่าเบาๆ แล้วใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ แล้วถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ BGLB บ่มที่ 35±2°ซ นาน 24-48 ชม. ตรวจดูการเกิดก๊าซและบันทึกผล

(7) คำนวณค่าเอ็มพีเอ็นต่อกรัม (MPN/ml) ของโคลิฟอร์มจากจำนวนหลอดอาหาร BGLB ที่มีก๊าซเกิดขึ้นตามตารางเอ็มพีเอ็น

(8) นำหลอดอาหาร Lauryl Sulfate Tryptose Broth ที่มีก๊าซเกิดขึ้นมาเขย่าเบาๆ ใช้ห่วงถ่ายเชื้อเผาไฟฆ่าเชื้อ ถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหาร EC broth เพาะเชื้อในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิ 45.5±2°ซ ตรวจดูการเกิดก๊าซหลังการบ่มเพาะนาน 24±2 ชั่วโมง ถ้าไม่มีก๊าซเกิดขึ้นให้บ่มเพาะต่อและตรวจดูการเกิดก๊าซอีกครั้งหลังจากบ่มนาน 48±2 ชั่วโมง คำนวณหาปริมาณเชื้อ Faecal Coliform จากตารางเอ็มพีเอ็น

(9) ใช้ห่วงถ่ายเชื้อเผาไฟฆ่าเชื้อ ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหาร EC broth ที่เกิดก๊าซ ขีดเป็นเส้น (Streak) ลงบนผิวหน้าอาหาร Levine-EMB agar บ่มเพาะเชื้อที่ 35±2°ซ นาน 24-48 ชม. ตรวจดูโคโลนีที่มีสีม่วงแดงเข้ม ลักษณะแบน มี metallic sheen

(10) ถ่ายเชื้อที่มีลักษณะเฉพาะตามข้อ 8 จานเพาะเชื้อละ 2 โคโลนี ลงในหลอดอาหาร Plate Count Agar ที่มีผิวหน้าเอียง โคโลนีละ 2 หลอด บ่มเพาะเชื้อที่ 35±2°ซ นาน 18-24 ชม.

(11) นำเชื้อจากหลอดอาหาร Plate Count Agar ที่บ่มเพาะนาน 18 ชั่วโมง มาย้อมสีกรัมดังนี้

- หยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ 1 หยด
- ใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะเชื้อจากหลอดอาหาร Plate Count Agar นำไปกระจายในหยดน้ำกลั่นบนสไลด์ ปล่อยให้แห้งในอากาศนำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อทำให้เชื้อติดแน่นบนสไลด์
- หยดสารละลาย Gram Crystal Violet ลงไปให้ท่วมบริเวณที่มีเชื้อ ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ
- หยดสารละลาย Gram Iodine ลงไปให้ท่วมบริเวณที่มีเชื้อ ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ
- ล้างสี Crystal Violet ส่วนเกินออกโดยเอียงสไลด์แล้วหยดแอลกอฮอล์ เข้มข้น 95% ให้ไหลผ่านสไลด์ 15-30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- หยดสารละลาย Gram Safranin ลงไปให้ท่วมบริเวณที่มีเชื้อ ทิ้งไว้นาน 15 วินาที ล้างออกด้วยน้ำ ซับน้ำ ทิ้งไว้ให้แห้ง

- ตรวจดูรูปร่าง ลักษณะการเรียงตัว และการติดสีกรัมของเชื้อ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์

(12) ถ้าพบเชื้อที่มีรูปร่างเป็นท่อนสั้นและกลม ติดสีกรัมลบ ไม่มีสปอร์ ให้นำหลอดอาหาร Plate Count Agar ที่เหลืออีกหลอดหนึ่งไปทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ดังนี้

- การทดสอบ Indole –เพาะเชื้อลงใน Tryptone Broth บ่มเชื้อที่ 35±2°ซ นาน 24± ชม. ทดสอบการสร้างอินโดลโดยหยด Kovac's reagent 0.2-0.3 มิลลิลิตร เมื่อมีสีแดงเกิดขึ้นในชั้นบนของหลอดอาหารแสดงว่าเกิดการสร้างอินโดล รายงานผลการทดสอบเป็นบวก ถ้าเป็นสีเหลืองแสดงว่าไม่มีการสร้างอินโดล รายงานผลการทดสอบเป็นลบ

- การทดสอบ Voges-Proskauer (VP) – เพาะเชื้อลงใน MR-VP Medium บ่มเชื้อที่ 35°ซ นาน 48±2 ชั่วโมง ใช้ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 13x100 มิลลิเมตร ทดสอบ VP โดยเติมสารละลาย Alpha-naphthol solution จำนวน 0.6 มิลลิลิตร และสารละลาย Potassium Hydroxide ความเข้มข้น 40% จำนวน 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม Creatin เล็กน้อย วางทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง เมื่อมีสีชมพู (Eosin Pink) เกิดขึ้น รายงานผลการทดสอบเป็นบวก ถ้าไม่เกิดการเปลี่ยนสี รายงานผลการทดสอบเป็นลบ

- การทดสอบ Methyl red – นำ MR-VP medium ที่เหลือไปบ่มที่ 35°ซ ต่ออีก 48±2 ชั่วโมง ทดสอบปฏิกิริยา Methyl Red โดยหยด Methyl red solution จำนวน 5 หยด ในแต่ละหลอด เมื่อมีสีแดงเกิดขึ้นรายงานผลการทดสอบเป็นบวก ถ้าเป็นสีเหลืองรายงานผลการทดสอบเป็นลบ

- การทดสอบ Citrate – เพาะเชื้อใน Simmons Citrate Agar โดยการแทง (Stab) ลงในวุ้นและขีดเป็นเส้นบนผิวหน้าของอาหารวุ้น บ่มที่ 35°ซ ต่ออีก 24±2 ชั่วโมง เมื่อมีโคโลนีเกิดขึ้นและอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีรายงานผลการทดสอบเป็นบวกและถ้าสีของอาหารไม่เปลี่ยนแปลงรายงานผลการทดสอบเป็นลบ

- การเกิดก๊าซจากแลคโตส – เพาะเชื้อลงในหลอดอาหาร Lauryl Sulfate Tryptose Broth บ่มที่ 35°ซ ต่ออีก 48±2 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดก๊าซ

- คำนวณค่า MPN ของ *E.coli* โดยเทียบค่าจากตาราง MPN ในภาคผนวก จากเชื้อที่ติดสีกรัมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้น ไม่มีสปอร์ ทำให้เกิดก๊าซจากน้ำตาลแลคโตส และให้ผลการทดสอบ IMViC (indole, methyl red, Voges-Proslauer และcitrate) เป็น + + - -หรือ - + - -

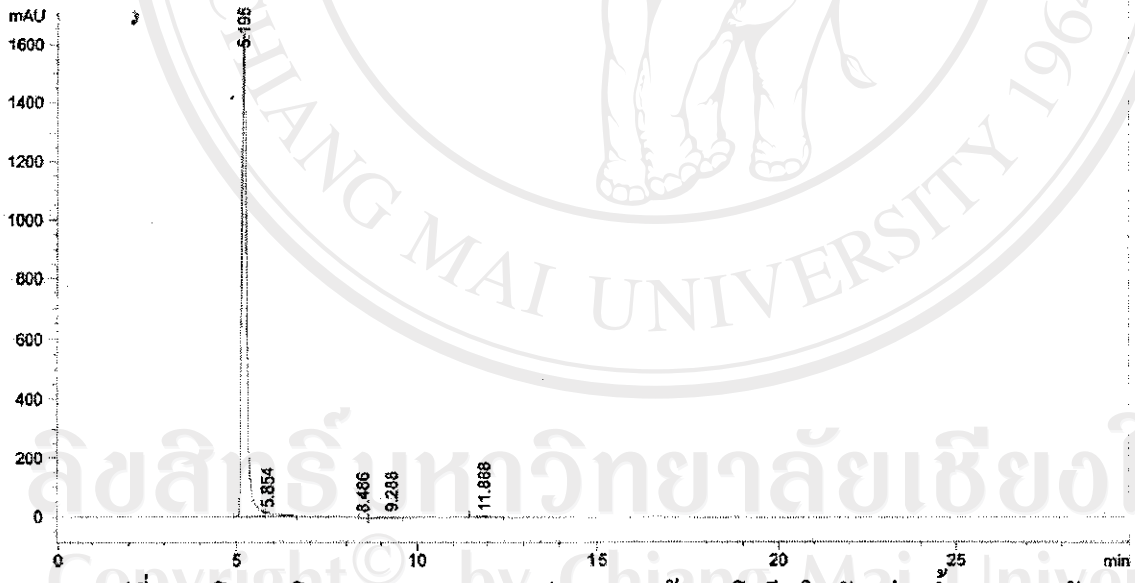
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

ผลโครมาโตแกรม
กราฟมาตรฐานแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีน
และ
ตารางผลของความดันและความร้อนต่อความคงตัวของ
แอลฟา-และเบต้า-แคโรทีนในน้ำแครอทแปรรูป

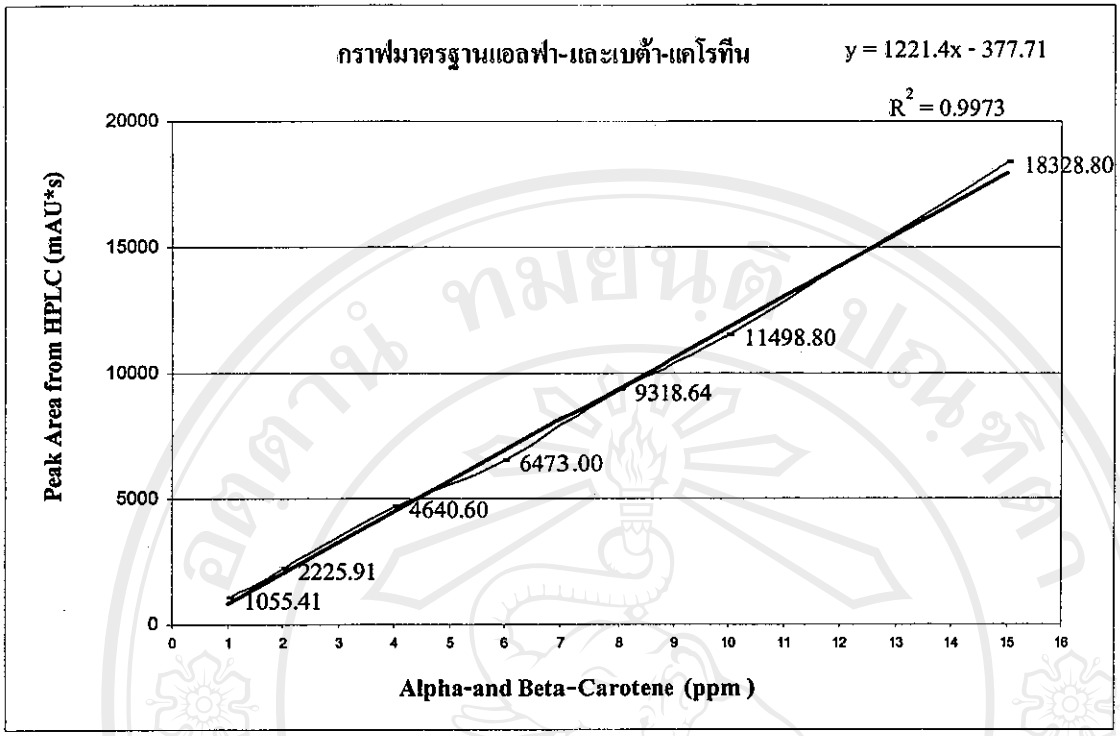
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ ค.1 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีน จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคHPLC



รูปที่ ค.2 โครมาโตแกรมของสารแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีนในตัวอย่างน้ำแครอทสกัดวิเคราะห์ด้วยเทคนิคHPLC

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ ค.3 กราฟมาตรฐานแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีนในสารละลายเคลื่อนที่ (Mobile phase)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก ค.4 ผลของความดันและความร้อนต่อความคงตัวของแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีนในน้ำแครอทแปรรูปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน (มิลลิกรัมต่อลิตรน้ำแครอท)

ระยะการเก็บ (วัน)	ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2	ชุดการทดลองที่ 3	ชุดการทดลองที่ 4
เริ่มต้น	$61.21^{a} \pm 1.11$	$60.74^{a} \pm 0.35$	$54.84^{c} \pm 0.29$	$52.13^{d} \pm 0.14$
5	$55.16^{c} \pm 0.05$	$56.99^{b} \pm 1.05$	$46.32^{f} \pm 0.08$	$35.16^{j} \pm 0.43$
10	$51.05^{e} \pm 0.14$	$56.73^{b} \pm 0.03$	$45.06^{g} \pm 0.13$	$33.93^{k} \pm 1.70$
15	$50.95^{e} \pm 0.34$	$56.61^{b} \pm 0.13$	$44.09^{h} \pm 0.27$	$33.90^{k} \pm 0.43$
20	$42.21^{i} \pm 0.20$	$54.97^{c} \pm 0.49$	$33.46^{k} \pm 0.26$	$33.20^{kl} \pm 0.33$
25	$33.99^{k} \pm 0.06$	$46.43^{f} \pm 0.46$	$32.23^{lm} \pm 0.35$	$26.12^{n} \pm 0.37$
30	$33.42^{k} \pm 0.56$	$46.29^{f} \pm 0.09$	$32.13^{m} \pm 0.43$	$22.15^{o} \pm 1.50$

หมายเหตุ

- ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ข้อมูลแสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
- ตัวเลขที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ
- ชุดที่ 1 น้ำแครอทผ่านการแปรรูปด้วยกระบวนการความดันสูง 400 เมกกะปาสคาล เวลา 15 นาที (HP 400)
- ชุดที่ 2 น้ำแครอทผ่านการแปรรูปด้วยกระบวนการความดันสูง 600 เมกกะปาสคาล เวลา 15 นาที (HP 600)
- ชุดที่ 3 น้ำแครอทผ่านการแปรรูปด้วยกระบวนการใช้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที (HT 9030)
- ชุดที่ 4 น้ำแครอทผ่านการแปรรูปด้วยกระบวนการใช้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส เวลา 60 วินาที (HT 9060)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายยุทธพงษ์ ปัญญาดา
วัน เดือน ปี เกิด	5 กุมภาพันธ์ 2524
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนฝางชนูปถัมภ์ เชียงใหม่ ปีการศึกษา 2541 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2545
ประสบการณ์	นักวิทยาศาสตร์ ตำแหน่งหัวหน้างานฝ่ายควบคุมคุณภาพ บริษัทไซอะกรา จำกัด เชียงใหม่ พ.ศ. 2546-2550

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved