



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

รูปการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการสุกษณะที่ดีในการผลิตน้ำพริกหนุ่ม



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved



รูป ก-1 การฝึกอบรมสุขลักษณะที่ดีในการผลิตน้ำพริกหนุ่ม



รูป ก-2 ปฏิบัติการผลิตน้ำพริกหนุ่มตามสุขลักษณะที่ดี

ภาคผนวก ข



วิธีการวิเคราะห์ทางกายภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

ข.1 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของน้ำ (a_w)

เปิดเครื่องวัด a_w อุณหภูมิประมาณ 30 นาที บรรจุตัวอย่างลงในตลับ a_w โดยบรรจุในปริมาณหนึ่งในสามของความสูงของตลับ a_w วางตลับลงใน chamber แล้วหมุนปุ่มไปยังตำแหน่ง READ ทิ้งไว้จนกระทั่งค่า a_w ปรากฏบนหน้าจอ บันทึกค่าที่ได้

ข.2 การวิเคราะห์ค่าสี

นำตัวอย่างบรรจุในภาชนะ เปิดเครื่องวัดสีแล้วทำการ calibrate เครื่องก่อนวัด จากนั้นเลือก mode สี L, a^* และ b^* นำหัวเครื่องวัดจุ่มลงในตัวอย่าง แล้วกดปุ่มวัด บันทึกค่าที่อ่านได้

ข.3 วิธีวิเคราะห์สมบัติทางเนื้อสัมผัส ด้วยเครื่อง Texture analyzer รุ่น TA.XT.Plus

อุปกรณ์

1. กระดาษชำระ
2. ช้อนตักสาร (spatula)

เครื่องมือ

1. เครื่อง texture analyzer รุ่น TA.XT.Plus
2. หัววัด back extrusion cell (A/BE) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร
3. เครื่องประมวลผล (computer)

วิธีวิเคราะห์

1. เปิดเครื่อง texture analyzer นานอย่างน้อย 30 นาที ทำการ calibrate force ด้วยตุ้มน้ำหนัก 2000 กรัม จากนั้นใส่หัววัด A/BE 35 ทำการ calibrate height
2. กำหนดค่าเพื่อการวิเคราะห์ ดังนี้

TA settings : Mode :	Measure Force in Compression
Option :	Return to Start
Pre-Test Speed :	N/A
Test Speed :	3.0 mm/s
Post-Test Speed :	10.0 mm/s
Distance :	23 mm
Trigger Type :	Button
Tare Mode :	Auto

Data Acquisition Rate : 200 pps

3. กำหนดค่าเพื่อการประมวลผล ดังนี้

MACRO : Clear Graph Results
 Search Forwards
 Go to Min. Time
 Go to Value : Force 10 g
 Drop Anchor : 1
 Go to Abs.+ve Value : Force
 Mark Value : Force
 Go to Value : Force 0 g
 Drop Anchor : 2
 Area
 Go to Abs.-ve Value : Force
 Mark Value : Force
 Go to Max. Time
 Drop Anchor : 3
 Area

4. ใส่ตัวอย่างในถ้วยสำหรับทำการวัด สูงจากก้นถ้วย 3 เซนติเมตร ไล่อากาศ และเกลี่ยผิวหน้าให้เรียบ เลื่อนหัววัดลงให้สัมผัสกับผิวหน้าของตัวอย่าง ทำการวัด
5. ประมวลผลโดย

จุดสูงสุดของกราฟ (maximum positive peak) คือ ค่า firmness

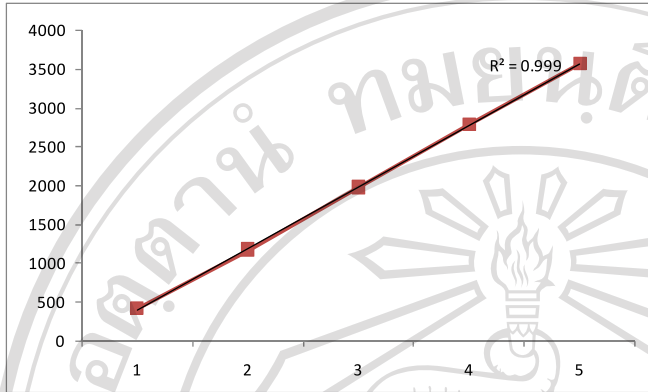
จุดต่ำสุดของกราฟ (maximum negative peak) คือ ค่า stickiness

พื้นที่ใต้กราฟบน (maximum positive area) คือ ค่า spreadability

พื้นที่ใต้กราฟล่าง (maximum negative area) คือ ค่า adhesion

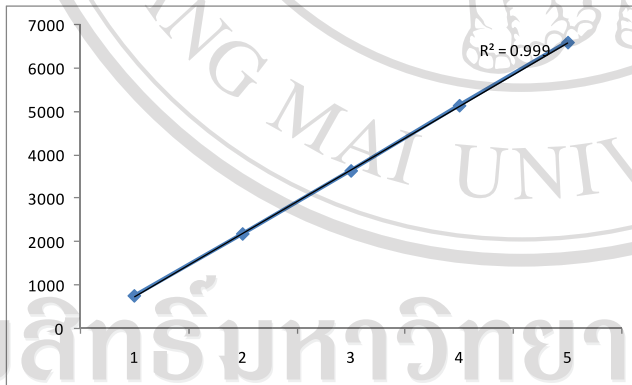


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป จ-1 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน กรดเบนโซอิกเข้มข้น 10 30 50 70 และ 90 ส่วนในล้านส่วน

ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่ใต้กราฟ
10	416.01028
30	1168.57068
50	1971.98254
70	2778.95337
90	3558.19824



รูป จ-2 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรด

ซอร์บิกเข้มข้น 10 30 50 70 และ 90 ส่วนในล้านส่วน

ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่ใต้กราฟ
10	764.48853
30	2190.77246
50	3643.77515
70	5145.38916
90	6600.52344

การคำนวณความเข้มข้นที่แท้จริง



$$X = \text{Amount} \times \frac{V_f D}{W}$$

X = ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
 Amount = ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
 V_f = ปริมาตรสุดท้าย (มิลลิลิตร)
 D = จำนวนเท่าของการเจือจาง (dilution)
 W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

ตัวอย่างการคำนวณ เช่น

ซังน้ำหนัตัวอย่าง 2 กรัม ผ่านกระบวนการสกัดและฉีดเข้าเครื่อง HPLC ได้ปริมาณสารออกมา

เท่ากับ 32.935 ppm

แทนค่าในสูตร

ความเข้มข้น = $32.935 \times \left[\frac{100 \times 1}{2} \right] = 411.68$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

การหาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%Recovery)

1. ชั่งตัวอย่างอาหารน้ำหนัก 2 กรัม โดยประมาณ เติมสารละลายมาตรฐานกรดเบนโซอิก เข้มข้น 1,000 ส่วนในล้านส่วนปริมาตร 3 มิลลิลิตร
2. เติมเมทานอลประมาณ 50 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยเมทานอล เขย่าให้เข้ากัน
3. ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที รินส่วนใสมารองด้วยชุดกรอง syringe filter แผ่นเมมเบรน CA 0.45 μm x 13 mm
4. ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
5. คำนวณปริมาณตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน
6. คำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ จากสูตรดังนี้

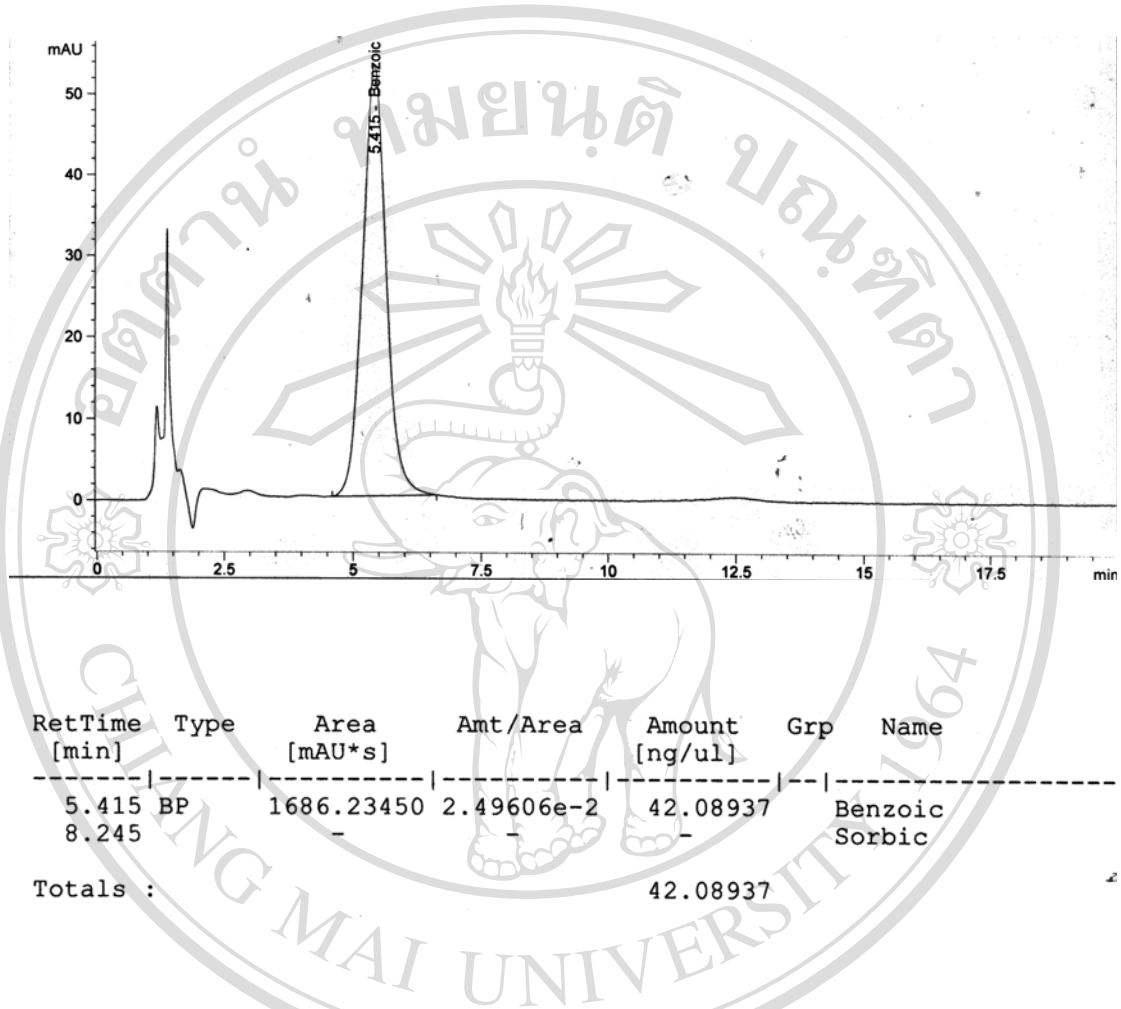
$$\text{เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ} = \left[\frac{C_2 - C_1}{C_{\text{added}} / W} \right] \times 100$$

C_1 = ปริมาณกรดเบนโซอิกในตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

C_2 = ปริมาณกรดเบนโซอิกในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

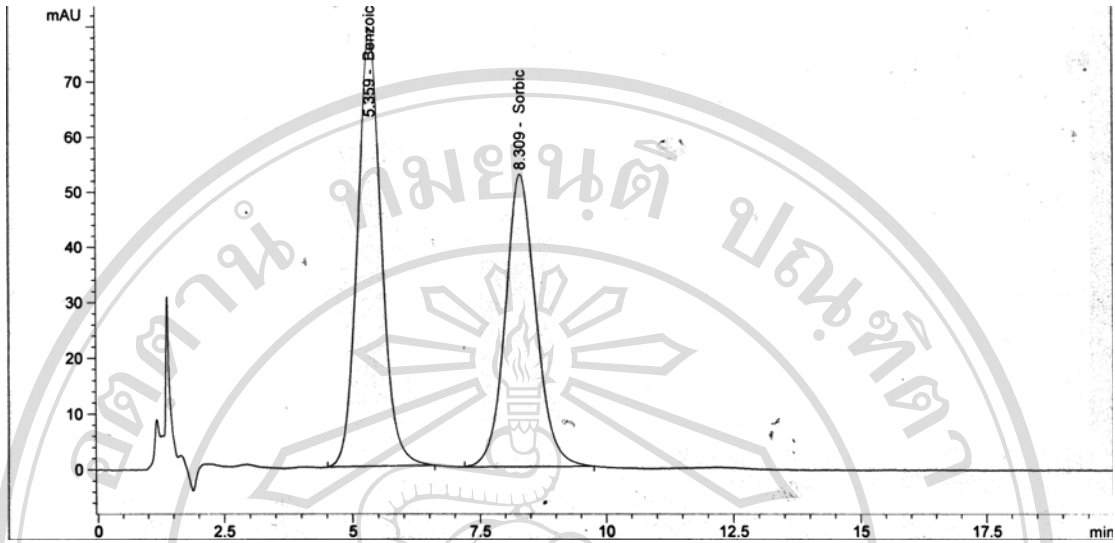
C_{added} = ปริมาณกรดเบนโซอิกที่เติมลงในตัวอย่าง (ไมโครกรัม)

W = น้ำหนักตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน (กรัม)



รูปจ-3 กราฟตัวอย่างแสดงผลการวิเคราะห์หัวตุ๊กกันเสียในตัวอย่างน้ำพริกหนุ่ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved



RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
5.359	BB	2548.86768	2.52208e-2	64.28436		Benzoic
8.309	BB	2224.80884	1.32059e-2	29.38066		Sorbic
Totals :				93.66502		

รูป จ-4 กราฟตัวอย่างแสดงผลการวิเคราะห์หัวตุ๊กกันเลีย ในตัวอย่างน้ำพริกหนุ่ม สารละลายมาตรฐานกรดซอร์บิกและเบนโซอิก 1,000 ppm

Benzoic acid

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright © by Chiang Mai University
 All rights reserved

$$\text{เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ} = \frac{3672.96 - 2405.02}{3000/2} \times 100 = 84.53\%$$

Sorbic acid

$$\text{เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ} = \frac{1,469.00 - 0}{3000/2} \times 100 = 97.93\%$$



ภาคผนวก ง

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ / วิเคราะห์ / การตรวจนับจุลินทรีย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 สารละลายบัฟเฟอร์เพปโทนความเข้มข้น 0.1%

เพปโทน (Peptone : Merck, Germany)	1.00	กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ละลายเพปโทนในน้ำกลั่น ให้เข้ากันดีโดยใช้เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (hot plate and magnetic stirrer) ปิเปตต์ใส่หลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตรสำหรับเจือจางตัวอย่าง (dilution) และใส่ขวดคูเรนขนาด 500 มิลลิลิตรขวดละ 500 มิลลิลิตรสำหรับการเตรียมตัวอย่าง นำไปฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารรุ้น PCA

อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA (Plate Count agar)	22.50	กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำกลั่น นำไปต้มทำการคนขณะต้มเพื่อป้องกันวันติดกันภาชนะ ต้มจนกระทั่งอาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ขวดคูเรนขนาด 500 มิลลิลิตรขวดละ 400 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

1.3 อาหารรุ้น PDA

อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose agar)	22.50	กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำกลั่น นำไปต้มทำการคนขณะต้มเพื่อป้องกันวันติดกันภาชนะ ต้มจนกระทั่งอาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ขวดคูเรนขนาด 500 มิลลิลิตรขวดละ 400 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

1.4 อาหารเหลวลอริลซัลเฟต (Lauryl Sulfate Broth)

อาหารลอริลซัลเฟต (Lauryl Sulfate broth)	35.60	กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ละลายอาหารด้วยน้ำกลั่นคนให้ละลายเข้ากันดี แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร ใส่หลอดดักก๊าซลงไป นำไปฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

1.5 อาหารเหลวบริลเลียนต์กรีน (Brilliant Green Bile Broth 2%)

อาหารบริลเลียนต์กรีน (Brilliant Green Bile Broth 2%)	40.00	กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ละลายอาหารด้วยน้ำกลั่นคนให้ละลายเข้ากันดี แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร ใส่หลอดดักก๊าซลงไป นำไปฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

1.6 อาหารเหลว EC (EC broth)

อาหาร EC (EC broth : Merck, Germany)	37.00	กรัม
น้ำกลั่น(distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ละลายอาหารด้วยน้ำกลั่นคนให้ละลายเข้ากันดี แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร ใส่หลอดดักก๊าซลงไป นำไปฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

1.7 อาหาร EMB agar

อาหาร (EMB agar : Merck, Germany)	36.00	กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ละลายอาหารด้วยน้ำกลั่นนำไปให้ความร้อนโดยการต้มหรือเข้าไมโครเวฟ คนเป็นระยะเพื่อให้วุ้นละลายได้ดีและไม่เกาะติดภาชนะ แบ่งใส่ขวดควมวุ้นขนาด 500 มิลลิลิตรขวดละ 400 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที นำอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาเทในเพลทพลาสติกเพลทละ 15 มิลลิลิตร โดยประมาณทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัวก่อนที่จะนำไปใช้งาน

1.8 อาหารแข็ง Simmons Citrate agar

อาหาร Simmons Citrate agar	24.30	กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ละลายอาหารด้วยน้ำกลั่นนำไปให้ความร้อนโดยการต้มหรือเข้าไมโครเวฟ คนเป็นระยะเพื่อให้
 วัสดุละลายได้ดีและไม่เกาะติดภาชนะ แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 3 มิลลิลิตรนำไปฆ่าเชื้อใน
 เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15
 นาที นำอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาวางเอียง (Slant) ทิ้งไว้ให้วัสดุแข็งตัวก่อนที่จะนำไปใช้งาน

1.9 น้ำทริปโทน (tryptone broth)

อาหาร	15	กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ละลายอาหารด้วยน้ำกลั่นคนให้ละลายเข้ากันดี แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร ใส่
 หลอดดักกิ้งาชลงไป นำไปฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน
 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

1.10 กลูโคสฟอสเฟตบรอก (Glucose Phosphate Broth: GPB)

เพปโทน (Peptone)	1.50	กรัม
Dipotassium hydrogenuhosphate	1.50	กรัม
กลูโคส (Glucose)	1.50	กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	300	มิลลิลิตร

ละลายอาหารด้วยน้ำกลั่นคนให้ละลายเข้ากันดี แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตร ใส่
 หลอดดักกิ้งาชลงไป

10.10 กรดทาทาริก 10% (Tartaric acid)

ชั่งกรดทาทาริก 10 ละลายน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่ง
 ความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที ใช้
 ปรับกรดอาหาร PDA

2. วิธีการวิเคราะห์

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (BAM, 2001)

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัมใส่ในถุง stomacher เติมสารละลาย 0.1% peptone water ปริมาณ 225 ml นำเข้าเครื่องตีปั่น (stomacher) อย่างน้อย 30 วินาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:10 เท่า (10^{-1})
2. ผสมสารละลายในหลอดทดลองให้เข้ากัน โดย เครื่องผสม (vortex) ทำเจือจางอาหาร โดยดูอาหารที่เจือจาง 1:10 (10^{-1}) ปริมาตร 1 ml ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย 0.1% peptone water หลอดละ 9 ml เขย่าให้เข้ากัน โดยเครื่องผสมจะได้อาหารที่มีความเจือจาง 1:100 (10^{-2}) ทำการเจือจางต่อไปด้วยวิธีการเดียวกันจนได้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม
3. ปิเปตสารละลาย ที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมจำนวน 3 ระดับความเข้มข้นที่ติดกัน ใส่ในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 ml ความเจือจางละ 2 จาน (duplicate)
4. เติมหาอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA หลอมเหลว อุณหภูมิ 44-46°C ประมาณ 12-15 ml ใส่ในจานเพาะเชื้อเขย่าจนให้สารละลายอาหารกระจายทั่วจานเพาะเชื้อ โดยเขย่าไปข้างหน้า ข้างหลัง หมุนวนตามเข็มนาฬิกา และทวนเข็มนาฬิกา ระวังไม่ให้อาหารเลอะติดฝาจานเลี้ยงเชื้อ
5. ปลอ่ยให้อาหารอุ่นแข็งตัว คว่ำจานเพาะเชื้อ บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 35-37°C นาน 48 ± 3 ชั่วโมง
6. นับจำนวนโคโลนีจากจานที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อทั้งสอง รายงานผลการตรวจนับในรูปโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม (CFU/g)

$$\text{สูตรการคำนวณ (CFU/g หรือ ml)} = \frac{\Sigma C}{(v_1 n_1 + 0.1 n_2) d}$$

โดยที่ v_1 = ปริมาตรของสารละลายที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

ΣC = ผลรวมของโคโลนีที่นับได้ทั้งหมดจากจานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 25-250 โคโลนี

n_1 = จำนวนจานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 25-250 โคโลนี ในระดับความเข้มข้นแรก

n_2 = จำนวนจานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 25-250 โคโลนี ในระดับความเข้มข้นที่สอง

d = ระดับความเข้มข้นแรกที่สมารถนับเชื้อได้ในช่วง 25-250 โคโลนี

วิธีการคำนวณเหมือนกับการคำนวณปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด แต่มีหลักการคำนวณเพิ่มเติม ดังนี้

1. กรณีตัวเลขหลักที่ 3 เป็นเลข 6 หรือ สูงกว่านี้ให้ปัดขึ้น เช่น $456 = 460$
2. กรณีตัวเลขหลักที่ 3 เป็นเลข 4 หรือ ต่ำกว่านี้ให้ปัดลง เช่น $454 = 450$
3. กรณีตัวเลขหลักที่ 3 เป็นเลข 5 ให้พิจารณาตัวเลขหลักที่ 2 ว่าน้อยกว่าหรือมากกว่า 5 โดยถ้าเลขหลักที่ 2 น้อยกว่า 5 ให้ปัดลง เช่น $445 = 440$ แต่ถ้าเลขหลักที่ 2 มากกว่า 5 ให้ปัดขึ้น เช่น $455 = 460$
4. กรณีไม่พบโคโลนีของเชื้อขึ้นเลยทุกระดับความเข้มข้น ให้รายงานการพบเชื้อยีสต์และรา น้อยกว่า 1 คูณด้วยระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อยีสต์และรา (BAM, 2001)

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ในถุง stomacher เติมสารละลาย 0.1% peptone water ปริมาณ 225 ml นำเข้าเครื่องตีปั่น (stomacher) อย่างน้อย 30 วินาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง $1:10$ เท่า (10^{-1})

2. ผสมสารละลายในหลอดทดลองให้เข้ากัน โดย เครื่องผสม (vortex) ทำเจือจางอาหาร โดยดูอาหารที่เจือจาง $1:10$ (10^{-1}) ปริมาตร 1 ml ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย 0.1% peptone water หลอดละ 9 ml เขย่าให้เข้ากัน โดยเครื่องผสมจะได้อาหารที่มีความเจือจาง $1:100$ (10^{-2}) ทำการเจือจางต่อไปด้วยวิธีการเดียวกันจนได้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม

3. ปิเปตสารละลาย ที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมจำนวน 3 ระดับความเข้มข้นที่ติดกัน ใส่ในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 ml ความเจือจางละ 2 จาน (duplicate)

4. เติมหาอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลอมเหลว อุณหภูมิ $44-46^{\circ}\text{C}$ ประมาณ 12-15 ml ใส่ในจานเพาะเชื้อเขย่าจนให้สารละลายอาหารกระจายทั่วจานเพาะเชื้อโดยเขย่าไปข้างหน้า ข้างหลัง หมุนวนตามเข็มนาฬิกา และทวนเข็มนาฬิกา ระวังไม่ให้อาหารเลอะติดฝาจานเลี้ยงเชื้อ

5. ปล่อยให้อาหารอุ่นแข็งตัว คั่วจานเพาะเชื้อ บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ $22-25^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 5 วัน

6. นับจำนวนโคโลนีจากจานที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อทั้งสอง รายงานผลการตรวจนับในรูปโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม (CFU/g)

2.3 โคลิฟอร์ม (Coliform bacteria) (BAM, 1998)

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในถุงตีปน เติมสารละลายเพื่อเจือจาง 225 มิลลิลิตร ตีปนนาน 2 นาที ได้สารละลายตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง $1:10$ (10^{-1})
2. ทำให้เจือจางต่ออีก 10 เท่า โดยใช้สารละลายตัวอย่างจากข้อ 1 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลายเพปโทนเพื่อเจือจาง 9 มิลลิลิตร จะได้สารละลายอาหารเจือจาง $1:100$ (10^{-2}) แล้วทำเจือจางต่อไปอีก 10 เท่า โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับที่กล่าวมา จะได้สารละลายอาหารเจือจาง $1:1000$ (10^{-3})
3. ปิเปตสารละลายเจือจางที่มีความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ lauryl sulfate tryptose broth (LSB) ที่บรรจุหลอดดักแก๊ส หลอดละ 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 หลอด
4. บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ± 2 ชั่วโมง สังเกตหลอดที่ขุ่นและเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊สให้อ่านผลเป็นบวก นำหลอดที่ให้ผลบวกไปทดสอบยืนยัน (confirmation) ต่อ
5. ตรวจสอบยืนยัน โดยนำหลอดที่ให้ผลบวก (เกิดก๊าซ) เกิดขึ้นมาเขย่าเบาๆ แล้วใช้ห่วงเย็บเชื้อซึ่งเผาไฟฆ่าเชื้อแล้ว เย็บเชื้อจำนวน 1 ห่วง (Loop) ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ brilliant green broth 2% ที่บรรจุหลอดดักแก๊ส บ่มเพาะเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ± 2 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดก๊าซและบันทึกผล
6. คำนวณค่าเอ็มพีเอ็นต่อกรัม (MPN/g) ของโคลิฟอร์มจากจำนวนหลอดอาหาร brilliant green broth 2% ที่ให้ผลบวก (มีก๊าซเกิดขึ้น) ตามตารางที่ ง-1

2.4 *Escherichia coli* (*E. coli*) (BAM, 1998)

1. นำหลอดอาหาร lauryl sulfate tryptose broth ที่มีก๊าซเกิดขึ้นมาเขย่าเบาๆ ใช้ห่วงถ่ายเชื้อเผาไฟฆ่าเชื้อ เย็บเชื้อจำนวน 1 ห่วง (Loop) ลงในหลอดอาหาร EC broth ที่บรรจุหลอดดักแก๊ส นำไปบ่มในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 45.5 องศาเซลเซียส สังเกตการเกิดก๊าซหลังการบ่มหลอดที่เกิดก๊าซให้อ่านค่าเป็นบวก นำไปอ่านค่าจาก ตาราง MPN ในตารางที่ ข-1 ภาคผนวก ข จะได้อ่านค่า MPN ของ faecal coliform จากตัวอย่างอาหาร 1 กรัม
2. ใช้ห่วงถ่ายเชื้อเผาไฟฆ่าเชื้อ ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหาร EC broth ที่เกิดก๊าซขีดเป็นเส้น (streak) ลงบนผิวหน้าอาหาร Levine-EMB agar บ่มเพาะเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบโคโลนีที่มีสีม่วงแดงเข้มมีจุดสีดำตรงกลาง ลักษณะแบน มี metallic sheen
3. ถ่ายเชื้อที่มีลักษณะเฉพาะตามข้อ 2 จำนวนเพาะเชื้อละ 2 โคโลนี ลงในหลอดอาหารที่ plate count agar มีผิวหน้าเอียง โคโลนีละ 2 หลอด บ่มเพาะเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-

24 ชั่วโมง ถ้าไม่มีโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะตามข้อ 2 ให้เลือกโคโลนีที่ลักษณะใกล้เคียงมากที่สุด
งานเพาะเชื้อละ 1 โคโลนี

4. นำเชื้อจากหลอดอาหาร plate count agar ที่บ่มเพาะนาน 18 ชั่วโมง มาข้อมสีกักรมดังนี้
 - 4.1 หยคน้ำกลั่นลงบนสไลด์ 1 หยด
 - 4.2 ใช้หัวถ่ายเชื้อแต่ละเชื้อจากหลอดอาหาร plate count agar นำไปกระจายในหยคน้ำกลั่นบนสไลด์ ปล่อยให้แห้งในอากาศ นำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อให้เชื้อติดแน่นบนสไลด์
 - 4.3 หยดสารละลาย gram crystal violet ลงไปให้ท่วมบริเวณที่มีเชื้อ ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ
 - 4.4 หยดสารละลาย gram iodine ลงไปให้ท่วมบริเวณที่มีเชื้อ ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ
 - 4.5 ล้างสี crystal violet ส่วนเกินออกโดยเอียงสไลด์แล้วหยดแอลกอฮอล์เข้มข้น 95% ให้ไหลผ่านสไลด์ 15-30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำ
 - 4.6 หยดสารละลาย gram safranin ลงไปให้ท่วมบริเวณที่มีเชื้อ ทิ้งไว้นาน 15 วินาที ล้างออกด้วยน้ำ ชับน้ำ ทิ้งไว้ให้แห้ง
 - 4.7 ตรวจสอบรูปร่าง ลักษณะการเรียงตัว และการติดสีกักรมของเชื้อ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์

ถ้าพบเชื้อที่มีรูปร่างเป็นท่อนสั้นและกลม ติดสีกักรมลบ ไม่มีสปอร์ ให้นำหลอดอาหาร plate count agar ที่เหลืออีกหลอดหนึ่งไปทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ดังนี้

- **การทดสอบ Indole** - เพาะเชื้อลงใน tryptone broth บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทดสอบการสร้างอินโดลโดยหยด kovac's reagent 1-2 หยด เมื่อเกิดวงแหวนสีแดงบนผิวด้านบนของหลอดอาหารแสดงว่าเกิดการสร้างอินโดล รายงานผลการทดสอบเป็นบวก (Positive) ถ้าเป็นสีเหลืองแสดงว่าไม่มีการสร้างอินโดล รายงานผลการทดสอบเป็นลบ (Negative)
- **การทดสอบ Voges-Proskauer (VP)** - เพาะเชื้อลงใน MR-VP medium บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ใช้ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 13x100 มิลลิเมตร ทดสอบ VP โดยเติมสารละลาย α -naphthol solution จำนวน 0.6 มิลลิลิตร และสารละลาย potassium hydroxide ความเข้มข้น 40% จำนวน 0.2

มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ถ้ามีสีชมพูหรือม่วงเกิดขึ้น รายงานผลการทดสอบเป็นบวก (Positive) ถ้าไม่เกิดการเปลี่ยนสี รายงานผลการทดสอบเป็นลบ (Negative)

- การทดสอบ **Methyl red** - นำ MR-VP medium ที่เหลือไปทดสอบปฏิกิริยา methyl red โดยหยด methyl red solution จำนวน 5 หยด เขย่าให้เข้ากัน เมื่อมีสีแดงเกิดขึ้นรายงานผลการทดสอบเป็นบวก (Positive) ถ้าเป็นสีเหลืองรายงานผลการทดสอบเป็นลบ (Negative)
- การทดสอบ **Citrate** - เพาะเชื้อในอาหารเลี้ยง Simmons citrate agar โดยการแทง (stab) ลงในรู และขีดเป็นเส้นบนผิวหน้าของอาหารรู้น บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส ต่ออีก 24 ชั่วโมง นำไปอ่านผลโดยดูการเปลี่ยนสีของบรอมไทมอลบลู ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสี รายงานผลการทดสอบเป็นบวก (Positive) และถ้าสีของอาหารไม่เปลี่ยนแปลงรายงานผลการทดสอบเป็นลบ (Negative)

คำนวณค่า MPN ของ *E. coli* โดยเทียบค่าจากตาราง MPN ในตาราง ง-1 จากเชื้อที่ติดสี กรัมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้น ไม่มีสปอร์ ทำให้เกิดก๊าซจากน้ำตาลแลคโตส และให้ผลการทดสอบ IMViC (indole, methyl red, Voges-Proskauer และ citrate) เป็น ++-- หรือ +---

Coliforms	Indole	Methyl Red	Voges-Proskauer	Citrate
<i>Escherichia coli</i>	+/-	+	-	-

การตรวจนับโคโลนีและการรายงานผล

$$N = \frac{\Sigma C}{v(n_1 + 0.1n_2)d}$$

- เมื่อ N = CFU/g หรือ ml
- v_1 = ปริมาตรของสารละลายที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ
- ΣC = ผลรวมของโคโลนีที่นับได้ทั้งหมดจากงานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 25-250 โคโลนี
- n_1 = จำนวนงานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 25-250 โคโลนี ในระดับความเข้มข้นแรก
- n_2 = จำนวนงานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 25-250 โคโลนี ในระดับความเข้มข้นที่ 2
- d = ระดับความเข้มข้นแรกที่สามารถนับเชื้อได้ในช่วง 25-250 โคโลนี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

- ถ้างานเพาะเชื้อทั้งสองงานหรืองานใดงานหนึ่งจาก ระดับความเจือจางเดียวกันมีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนีให้นำมาหาค่าเฉลี่ย (ทศนิยม 1 ตำแหน่ง) คูณด้วยระดับความเจือจางนั้นๆ (dilution factor) เช่น

ความเข้มข้น 10^{-4}



150 โคโลนี



156 โคโลนี

แทนค่าในสูตร $N = \frac{150+156}{1(2+(0.1 \times 0))} 10^{-4} = 153 \times 10^4 = 1.53 \times 10^6 \text{ CFU/g}$

- ถ้า 2 ระดับความเจือจางที่ติดกันมีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนีให้ทำการหาค่าเฉลี่ยของแต่ละความเจือจาง คูณด้วยระดับความเจือจางนั้นๆ (dilution factor) แล้วนำค่าที่ได้มาเฉลี่ยกัน เช่น

ความเข้มข้น 10^{-3}



240 โคโลนี



245 โคโลนี

ความเข้มข้น 10^{-4}



25 โคโลนี



28 โคโลนี

แทนค่าในสูตร $N = \frac{240+245+25+28}{1(2+(0.1 \times 2))} 10^{-3} = 244.54 \times 10^3 = 2.45 \times 10^5 \text{ CFU/g}$

- กรณีที่จำนวนโคโลนีในทุกงานเพาะเชื้อมีน้อยกว่า 25 โคโลนี ให้รายงานผลตรวจนับโคโลนีที่ความเจือจางต่ำสุดโดยรายงานว่ามีโคโลนี น้อยกว่า 25 คูณ กับ dilution factor เท่ากับความเจือจางต่ำสุดที่ทำการตรวจนับ หรือ เช่นที่ 10^{-1} พบโคโลนี 5 โคโลนี ให้รายงานว่ามีแบคทีเรีย น้อยกว่า 25×10^1 หรือ น้อยกว่า 250 โคโลนี

- ถ้าทุกความเจือจางไม่มีโคโลนีขึ้นเลย ให้รายงานว่ามีจำนวนน้อยกว่า 1×10^x เมื่อ x เท่ากับความเจือจางต่ำสุดที่ทำการตรวจนับ เช่นที่ 10^{-1} ไม่พบโคโลนีเลย ให้รายงานว่ามีแบคทีเรีน้อยกว่า 1×10^1 หรือ น้อยกว่า 10 โคโลนี
- กรณีที่จำนวนโคโลนีในทุกจานเพาะเชื้อมีมากกว่า 250 โคโลนี แต่โดยเฉลี่ยแล้วมีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 100 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร ให้คำนวณจากจานที่มีจำนวนใกล้เคียงกับ 250 โคโลนีมากที่สุด เช่น

โคโลนีที่นับได้		เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยประมาณ /มล. หรือ (กรัม) (EAPC*/ml or g)
ความเข้มข้น 1:100	ความเข้มข้น 1:1000	
TNTC**	640	640,000

* EAPC = Estimated Aerobic Plate Count **TNTC = to numerous to count

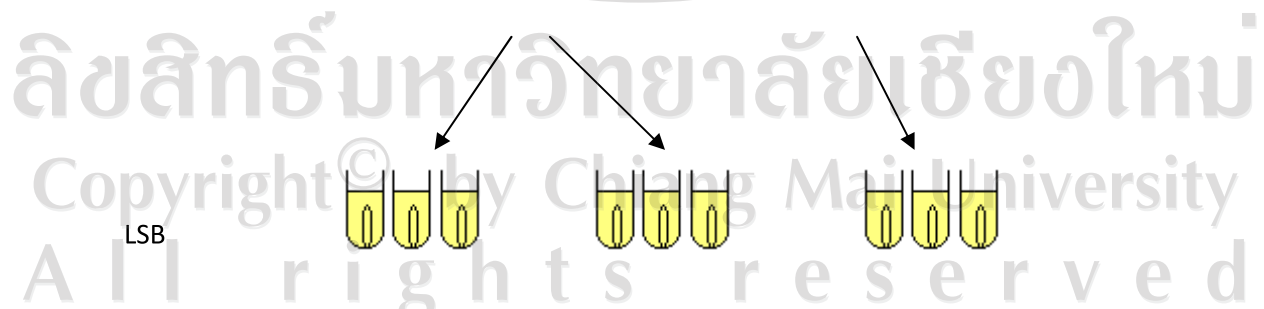
- กรณีที่ทุกจานมีเชื้อแผ่กระจาย (spreader) เต็มจานและ/หรือเกิดข้อผิดพลาดจากการปฏิบัติการ (laboratory accident) ให้รายงานดังนี้
 - 1.1 เชื้อแผ่กระจาย ให้รายงานว่า “spreader (SPR)”
 - 1.2 เกิดข้อผิดพลาดจากการปฏิบัติการ ให้รายงานว่า “laboratory accident (LA)”

แผนผังการตรวจหาเชื้อ coliform และ *E. coli*

ตัวอย่างน้ำพริกหนุ่มเจือจางในเพปโทน

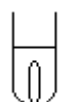


อัตราส่วน 1:10

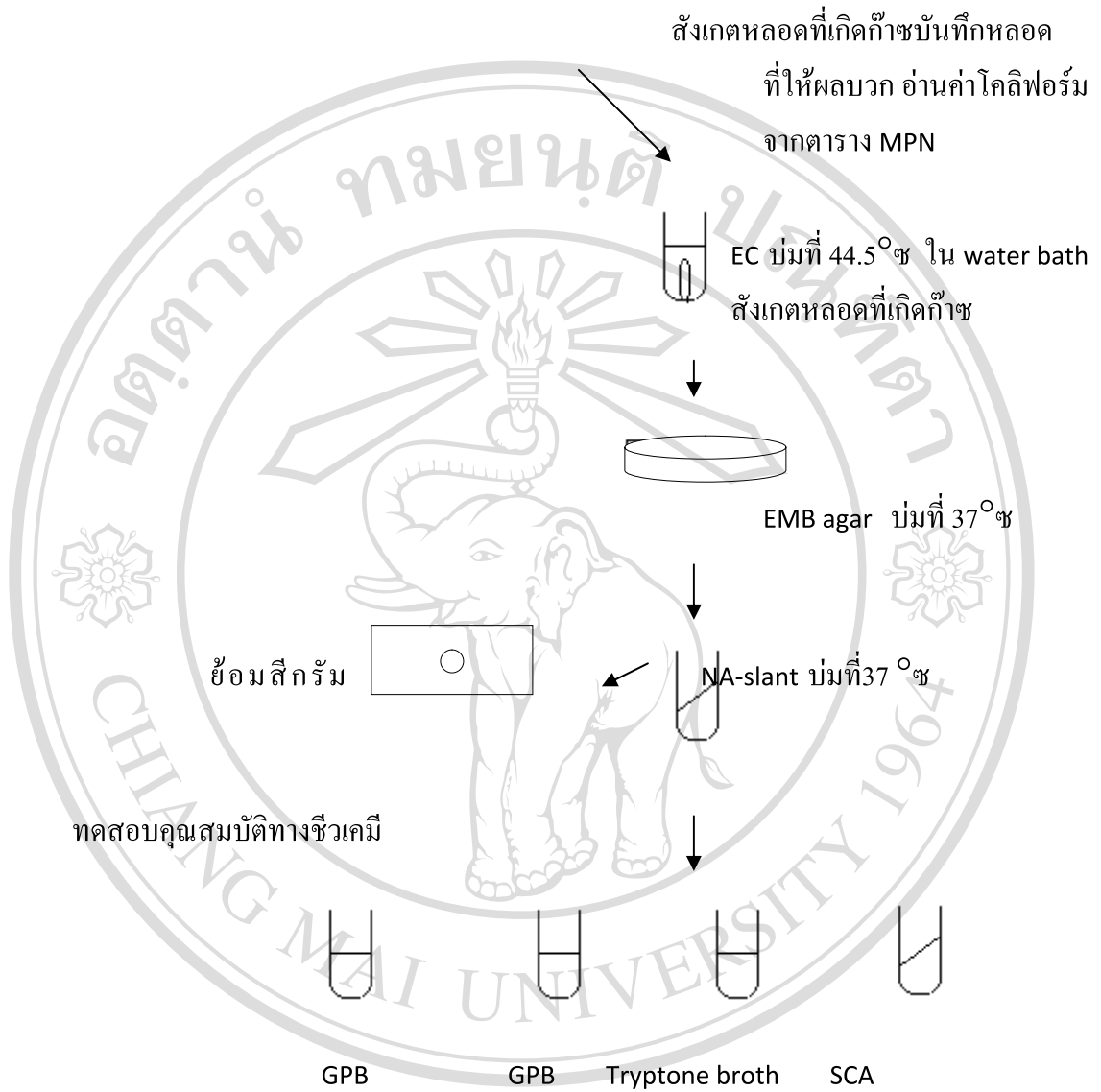


LSB

บ่มที่ 37°C นาน 24-28 ชม. สังเกตหลอดที่เกิดก๊าซ



BGLBB บ่มที่ 37°C นาน 24-48 ชม.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- MR-test - VP- test - Indole test - Citrate test

ค่าเอ็มพีเอ็นต่อกรัม (MPN/g) ของตัวอย่างอาหาร

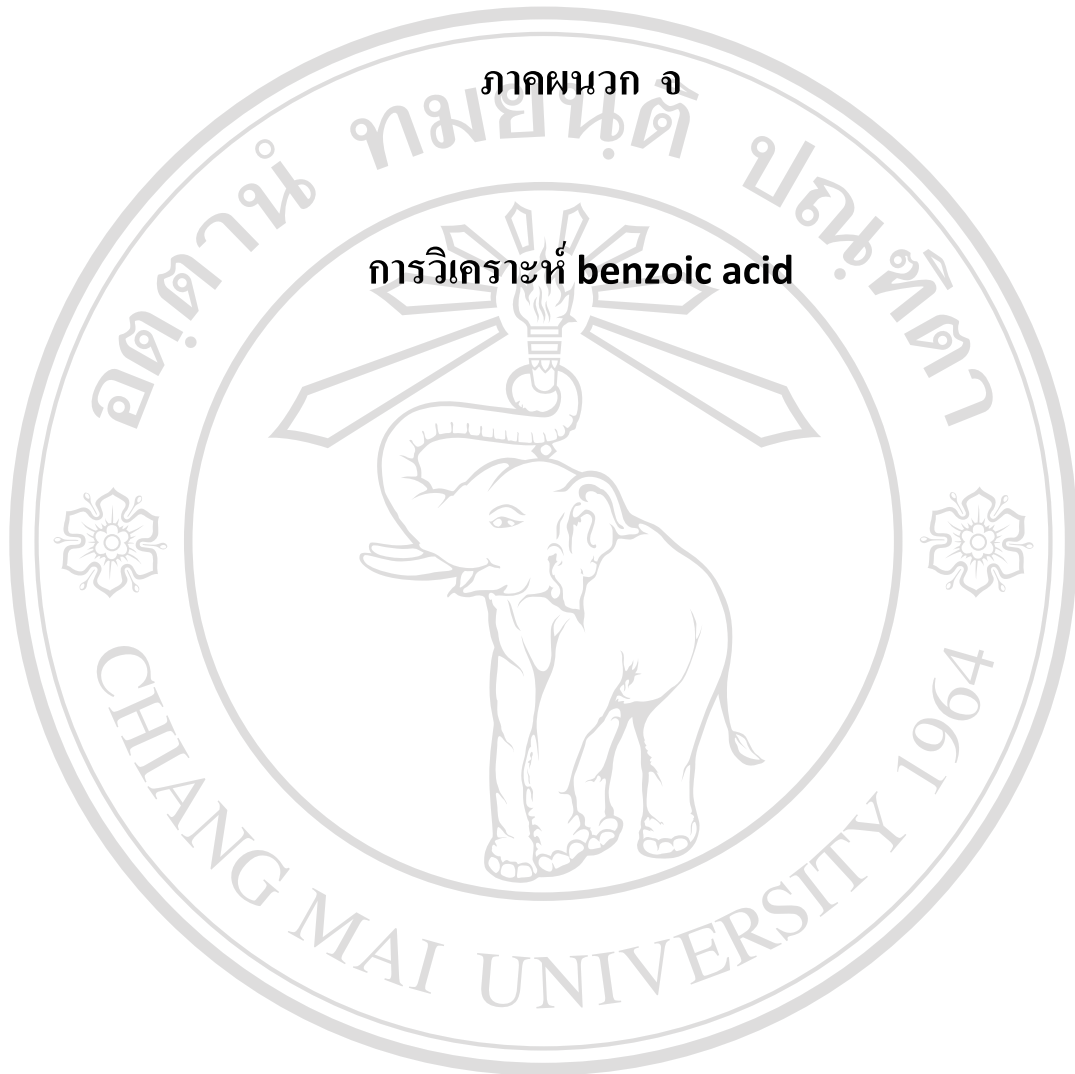
ตาราง ง-1 ค่าเอ็มพีเอ็นต่อกรัม (MPN/g) ของตัวอย่างอาหาร เมื่อใช้ตัวอย่าง 0.1 0.01 และ 0.001 กรัม ความเข้มข้นละ 3 หลอด

จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก				จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก			
0.1	0.01	0.001	MPN/g	0.1	0.01	0.001	MPN/g
0	0	0	<3	2	0	0	9.1
0	0	1	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	20
0	0	3	9	2	0	3	26
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6.1	2	1	1	20
0	1	2	9.2	2	1	2	27
0	1	3	12	2	1	3	34
0	2	0	6.2	2	2	0	21
0	2	1	9.3	2	2	1	28
0	2	2	12	2	2	2	35
0	2	3	16	2	2	3	42
0	3	0	9.4	2	3	0	29
0	3	1	13	2	3	1	36
0	3	2	16	2	3	2	44
0	3	3	19	2	3	3	53
1	0	0	3.6	3	0	0	23
1	0	1	7.2	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	64
1	0	3	15	3	0	3	95
1	1	0	7.3	3	1	0	43
1	1	1	11	3	1	1	75
1	1	2	15	3	1	2	120

ตาราง ง-1 (ต่อ)

จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก				จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก			
0.1	0.01	0.001	MPN/g	0.1	0.01	0.001	MPN/g
1	1	3	19	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	2	2	20	3	2	2	210
1	2	3	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1	20	3	3	1	460
1	3	2	24	3	3	2	1100
1	3	3	29	3	3	3	>1100

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved



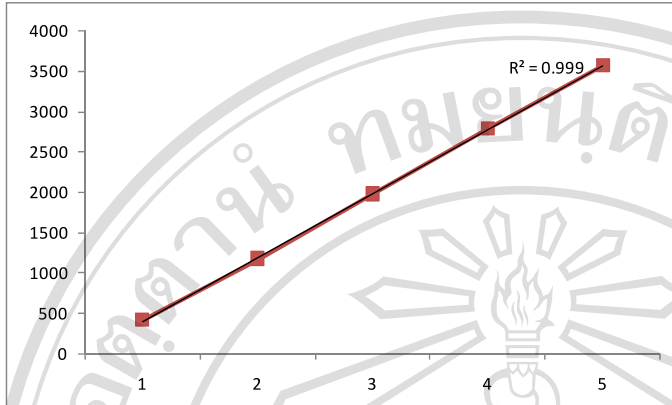
ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ benzoic acid

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

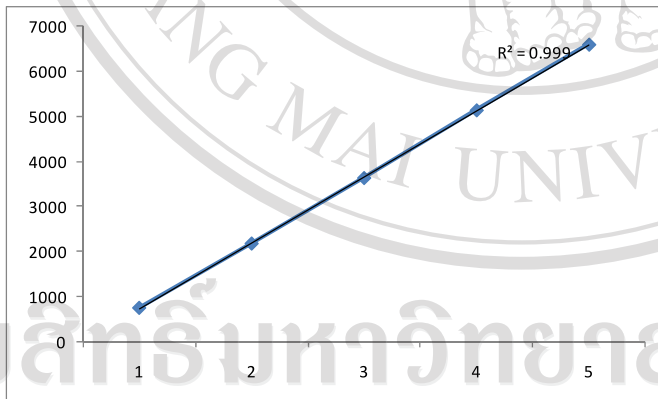
Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved



ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่ใต้กราฟ
10	416.01028
30	1168.57068
50	1971.98254
70	2778.95337
90	3558.19824

รูป จ-1 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน กรดเบนโซอิกเข้มข้น 10 30 50 70 และ 90 ส่วนในล้านส่วน



ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่ใต้กราฟ
10	764.48853
30	2190.77246
50	3643.77515
70	5145.38916
90	6600.52344

รูป จ-2 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน กรดซอร์บิกเข้มข้น 10 30 50 70 และ 90 ส่วนในล้านส่วน

การคำนวณความเข้มข้นที่แท้จริง

$$X = \text{Amount} \times \left[\frac{V_f D}{W} \right]$$

X	= ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
Amount	= ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
V _f	= ปริมาตรสุดท้าย (มิลลิลิตร)
D	= จำนวนเท่าของการเจือจาง (dilution)
W	= น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

ตัวอย่างการคำนวณ เช่น

ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 2 กรัม ผ่านกระบวนการสกัดและฉีดเข้าเครื่อง HPLC ได้ปริมาณสารออกมาเท่ากับ 32.935 ppm

แทนค่าในสูตร

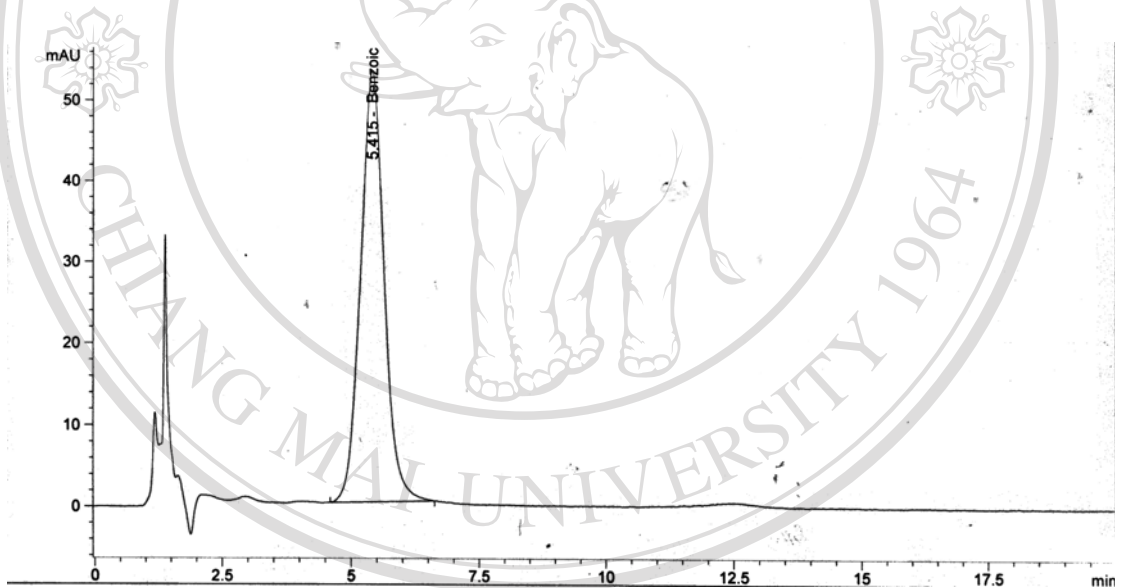
$$\text{ความเข้มข้น} = 32.935 \times \left[\frac{100 \times 1}{2} \right] = 411.68 \text{ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม}$$

การหาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%Recovery)

1. ชั่งตัวอย่างอาหารน้ำหนัก 2 กรัม โดยประมาณ เติมสารละลายมาตรฐานกรดเบนโซอิกเข้มข้น 1,000 ส่วนในล้านส่วนปริมาตร 3 มิลลิลิตร
2. เติมเมทานอลประมาณ 50 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยเมทานอล เขย่าให้เข้ากัน
3. ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที รินส่วนใสมารองด้วยชุดกรอง syringe filter แผ่นเมมเบรน CA 0.45 $\mu\text{m} \times 13 \text{ mm}$
4. ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
5. คำนวณปริมาณตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน
6. คำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ จากสูตรดังนี้

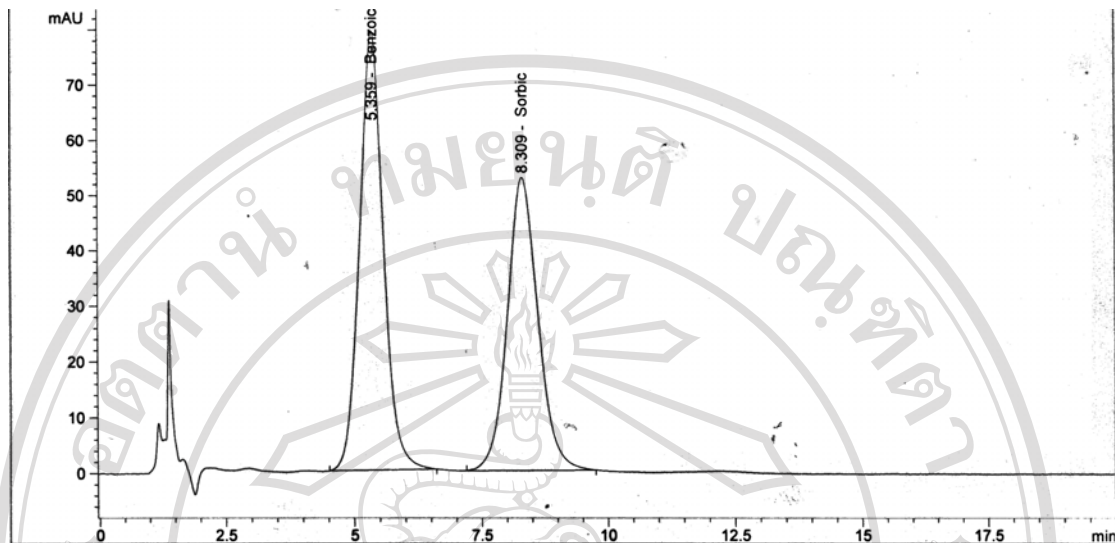
$$\text{เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ} = \left[\frac{C_2 - C_1}{C_{\text{added}} / W} \right] \times 100$$

- C₁ = ปริมาณกรดเบนโซอิกในตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
- C₂ = ปริมาณกรดเบนโซอิกในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
- C_{added} = ปริมาณกรดเบนโซอิกที่เติมลงในตัวอย่าง (ไมโครกรัม)
- W = น้ำหนักตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน (กรัม)



RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
5.415	BP	1686.23450	2.49606e-2	42.08937		Benzoic
8.245						Sorbic
Totals :				42.08937		

รูป จ-3 กราฟตัวอย่างแสดงผลการวิเคราะห์หัตถุกันเสียในตัวอย่างน้ำพริกหนุ่ม



RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
5.359	BB	2548.86768	2.52208e-2	64.28436		Benzoic
8.309	BB	2224.80884	1.32059e-2	29.38066		Sorbic
Totals :				93.66502		

รูป จ-4 กราฟตัวอย่างแสดงผลการวิเคราะห์วัตถุกันเสีย ในตัวอย่างน้ำพริกหนุ่ม สารละลายมาตรฐานกรดซอร์บิกและเบนโซอิก 1,000 ppm

Benzoic acid

$$\text{เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ} = \left[\frac{3672.96 - 2405.02}{3000/2} \right] \times 100 = 84.53\%$$

Sorbic acid

$$\text{เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ} = \left[\frac{1,469.00 - 0}{3000/2} \right] \times 100 = 97.93\%$$

ประวัติผู้เขียน



ชื่อ-สกุล

นางสาวสินากรณ์ แก้วชื่นชัย

วัน เดือน ปี เกิด

20 มีนาคม 2520

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนชินรสวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2538

สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปีการศึกษา 2542

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved