ภาคผนวก ก

ภาพประกอบ

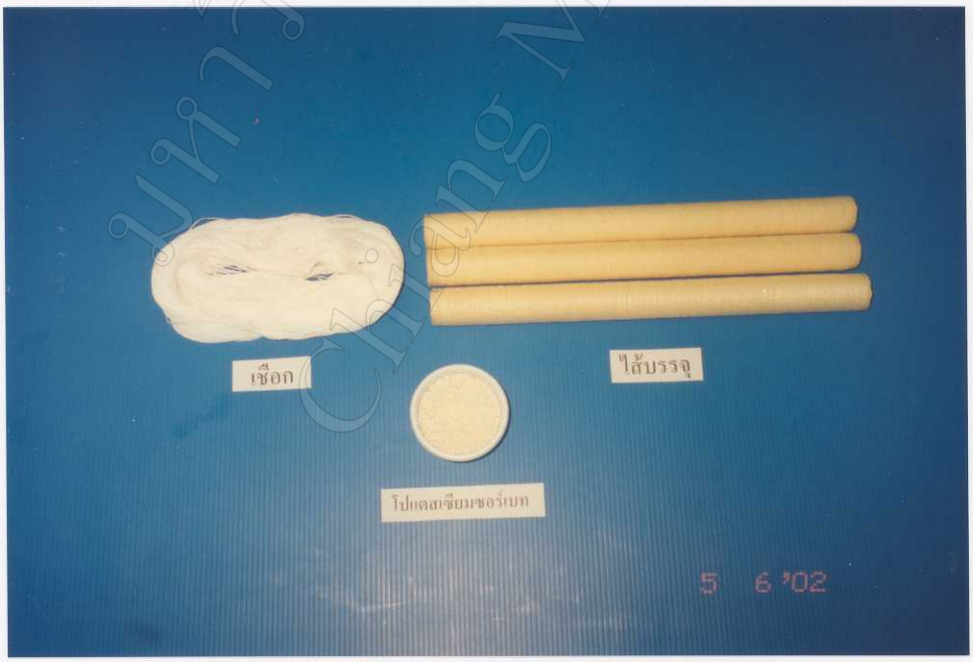
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาพ ก.1 ส่วนประกอบในสูตรผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยว

ภาพ ก.2 ส่วนประกอบในส่วนผสมหลัก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาพ ก.3 เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นที่ใช้ในการทดลอง



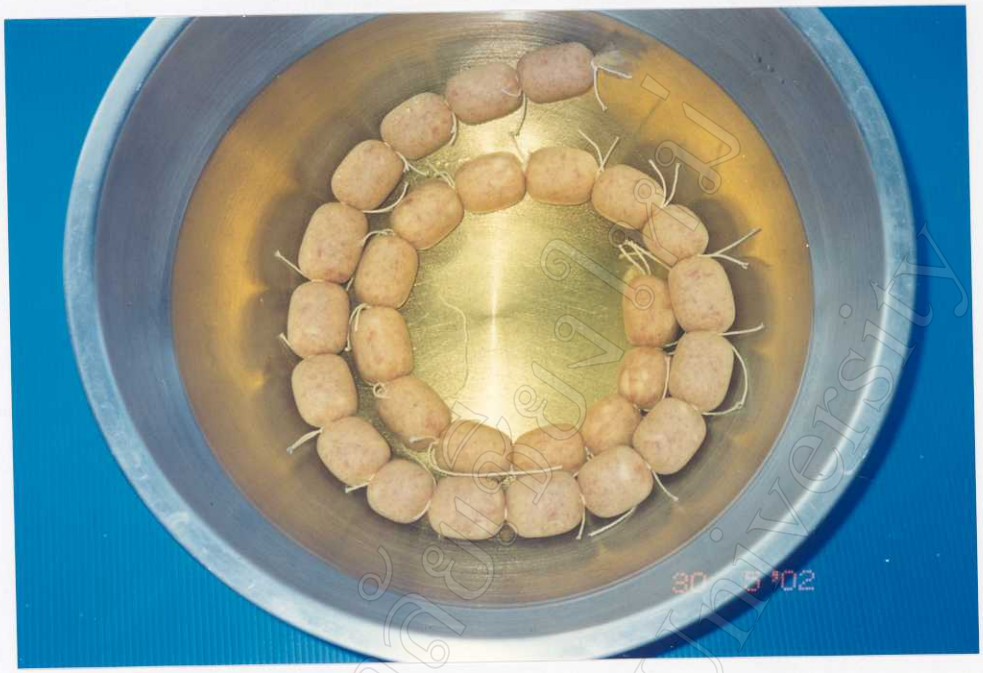
ภาพ ก.4 เชือก ไส้บรรจุ และสารโปแตสเซียมซอร์เบท

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาพ ก.5 เครื่องผสม

ภาพ ก.6 เครื่องอัดไส้ (Stuffer)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



ภาพ ก.7 การจุ่มผลิตภัณฑ์ลงในสารละลายโปแตสเซียมซอร์เบท

ภาพ ก.8 ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวที่บรรจุแบบปิดผนึกธรรมดาและสุญญากาศ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University

ภาพ ก.9 ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ยังไม่ผ่านการทำให้สุก

ภาพ ก.10 ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเมื่อผ่านการทำให้สุก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาพ ก.11 ลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวที่ไม่จุ่มสารละลายโปแตสเซียมซอร์เบท และบรรจุแบบปิดผนึกธรรมดา ซ้าย : วันเริ่มต้น ขวา : 2 วัน

ภาพ ก.12 ลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวที่ไม่จุ่มสารละลายโปแตสเซียมซอร์เบท และบรรจุแบบปิดผนึกสุญญากาศ ซ้าย : วันเริ่มต้น ขวา : 8 วัน

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ Mae Jo University

ภาพ ก.13 ลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวที่จุ่มสารละลายโปแตสเซียมซอร์เบท และบรรจุแบบปิดผนึกธรรมดา ซ้าย : วันเริ่มต้น ขวา : 12 วัน

ภาพ ก.14 ลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวที่จุ่มสารละลายโปแตสเซียมซอร์เบท และบรรจุแบบปิดผนึกสุญญากาศ ซ้าย : วันเริ่มต้น ขวา : 12 วัน

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ Maejo University

ภาคผนวก ข

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

แบบทดสอบเค้าโครงผลิตภัณฑ์

ผู้ทดสอบชิม..... วันที่.....

ผลิตภัณฑ์ : ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยว

ลักษณะผลิตภัณฑ์ : เป็นไส้กรอกหมักที่มีส่วนผสมหลัก ได้แก่ เนื้อหมู มันแข็ง และข้าวเหนียว มีรสเปรี้ยว นิยมนำไปปิ้งหรือย่างก่อนรับประทาน โดยทั่วไปนิยมเรียกว่า ไส้กรอกอีสาน

กรุณากรอกแบบสอบถามให้ตรงกับตวามต้องการของท่านมากที่สุด โดย

1. ระบุหัวข้อ "ลักษณะของผลิตภัณฑ์" ที่ท่านคิดว่าสำคัญลงในแต่ละหัวข้อ
2. กำหนดเครื่องหมาย I ลงบนสเกลในตำแหน่งที่ท่านคิดว่าเป็นระดับที่ดีที่สุดของลักษณะนั้น ๆ ของผลิตภัณฑ์ในอุดมคติ (Ideal)
3. กำหนดเครื่องหมาย X ลงบนสเกลในตำแหน่งที่คิดว่าเป็นระดับของลักษณะนั้น ๆ ของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง

ลักษณะปรากฏ

..... |——————————————————————————|

....

..... |——————————————————————————|

....

กลิ่นและรสชาติ

..... |——————————————————————————|

....

..... |——————————————————————————|

....

ลักษณะเนื้อสัมผัส

..... |——————————————————————————|

....

..... |——————————————————————————|

....

การยอมรับโดยรวม

..... |——————————————————————————|

....

ขอขอบคุณที่กรุณาให้ความร่วมมือ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส
ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยว

ผู้ทดสอบชิม..... วันที่.....

กรุณากำหนดเครื่องหมาย X ในตำแหน่งที่ท่านคิดว่าเป็นระดับของลักษณะนั้น ๆ ของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง เมื่อกำหนดให้เครื่องหมาย I เป็นระดับในอุดมคติของลักษณะที่ท่านต้องการ

สีของผลิตภัณฑ์ก่อนการทำให้สุก

สีของผลิตภัณฑ์หลังการทำให้สุก

รสเค็ม

รสเปรี้ยว

กลิ่นเปรี้ยว

ความเหนียว

ความฉ่ำน้ำ

การยอมรับโดยรวม

ขอขอบคุณที่กรุณาให้ความร่วมมือ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

คำอธิบายประกอบการทดสอบทางประสาทสัมผัส

ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวเป็นผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักที่วางจำหน่ายให้แก่ผู้บริโภคในขณะที่ผลิตภัณฑ์มีลักษณะดิบ และต้องผ่านการทำให้สุกก่อนบริโภค การทดสอบทางประสาทสัมผัสแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ ลักษณะปรากฏ กลิ่นและรสชาติ ลักษณะเนื้อสัมผัส และการยอมรับโดย โดยลักษณะ (Attributes) ที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ สีของผลิตภัณฑ์ก่อนการทำให้สุก สีของผลิตภัณฑ์หลังการทำให้สุก รสเค็ม รสเปรี้ยว กลิ่นเปรี้ยว ความเหนียว ความฉ่ำน้ำ และการยอมรับโดยรวม

คำอธิบายลักษณะของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวมีดังนี้

สีของผลิตภัณฑ์ก่อนการทำให้สุก หมายถึง สีของผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกรรมวิธีการผลิตจนครบและยังไม่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนเพื่อการบริโภค

สีของผลิตภัณฑ์หลังการทำให้สุก หมายถึง สีของผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการอบให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 180-200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

รสเค็ม หมายถึง รสเค็มที่ผู้ทดสอบชิมรู้สึกเมื่อทำการชิมผลิตภัณฑ์ อันเนื่องมาจากการปรับปรุงรสชาติขณะทำการพัฒนาผลิตภัณฑ์

รสเปรี้ยว หมายถึง รสเปรี้ยวของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวที่ผู้ทดสอบชิมรู้สึกเมื่อทำการชิม อันเนื่องมาจากปริมาณกรดที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์

กลิ่นเปรี้ยว หมายถึง กลิ่นเปรี้ยวของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวที่ผู้ทดสอบชิมรู้สึกเมื่อทำการทดสอบทางประสาทสัมผัส ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นที่ใช้ในการทดลอง

ความเหนียว หมายถึง ความเหนียวของเนื้อในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวที่ผู้ทดสอบชิมรู้สึกได้เมื่อทำการกดเนื้อผลิตภัณฑ์

ความฉ่ำน้ำ หมายถึง ความฉ่ำน้ำของผลิตภัณฑ์ที่ผู้ทดสอบชิมรู้สึกได้เมื่อสัมผัสเนื้อของผลิตภัณฑ์

การยอมรับโดยรวม หมายถึง การประเมินการยอมรับทางประสาทสัมผัสโดยรวมที่ผู้ทดสอบชิมมีต่อผลิตภัณฑ์ โดยพิจารณาจากลักษณะที่สำคัญทั้ง 7 ลักษณะข้างต้น

ภาคผนวก ค

ตารางสถิติ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตาราง ข.1 The distribution of t

Degree of	Probability of larger value, sign ignored								
Freedom	0.500	0.400	0.200	0.100	0.050	0.025	0.010	0.005	0.001
1	1.000	1.376	3.078	6.314	12.706	25.452	63.657		
2	0.816	1.061	1.886	2.920	4.303	6.205	9.925	14.089	31.598
3	0.765	0.978	1.638	2.353	3.182	4.176	5.841	7.453	12.941
4	0.741	0.941	1.533	2.132	2.776	3.495	4.604	5.598	8.610
5	0.727	0.920	1.476	2.015	2.571	3.163	4.032	4.773	6.859
6	0.718	0.906	1.440	1.943	2.441	2.969	3.707	4.317	5.959
7	0.711	0.896	1.415	1.895	2.356	2.841	3.499	4.029	5.405
8	0.706	0.889	1.397	1.860	2.306	2.752	3.355	3.832	5.041
9	0.703	0.883	1.383	1.833	2.262	2.685	3.250	3.690	4.781
10	0.700	0.879	1.372	1.812	2.228	2.634	3.169	3.581	4.587
11	0.697	0.876	1.363	1.796	2.201	2.593	3.106	3.497	4.437
12	0.695	0.873	1.356	1.782	2.179	2.560	3.055	3.428	4.318
13	0.694	0.870	1.350	1.771	2.160	2.533	3.012	3.372	4.221
14	0.692	0.868	1.345	1.761	2.145	2.510	2.977	3.326	4.140
15	0.691	0.866	1.341	1.759	2.131	2.490	2.947	3.286	4.073
16	0.690	0.865	1.337	1.746	2.120	2.473	2.921	3.252	4.015
17	0.689	0.863	1.333	1.740	2.110	2.458	2.898	3.222	3.965
18	0.688	0.862	1.330	1.734	2.101	2.445	2.878	3.197	3.922
19	0.688	0.861	1.328	1.729	2.093	2.443	2.861	3.174	3.883
20	0.687	0.860	1.325	1.725	2.086	2.423	2.845	3.153	3.850
21	0.686	0.859	1.323	1.721	2.080	2.414	2.831	3.135	3.819
22	0.686	0.858	1.321	1.717	2.074	2.406	2.819	3.119	3.792
23	0.685	0.858	1.319	1.714	2.069	2.398	2.807	3.104	3.767
24	0.685	0.857	1.318	1.711	2.064	2.391	2.797	3.090	3.745
25	0.684	0.856	1.316	1.708	2.060	2.385	2.787	3.078	3.725
26	0.684	0.856	1.315	1.706	2.056	2.379	2.779	3.067	3.707
27	0.684	0.855	1.314	1.703	2.052	2.373	2.771	3.056	3.690
28	0.683	0.855	1.313	1.701	2.048	2.368	2.763	3.047	3.674
29	0.683	0.854	1.311	1.699	2.045	2.364	2.756	3.038	3.659
30	0.683	0.854	1.310	1.697	2.042	2.360	2.750	3.030	3.646
35	0.682	0.852	1.306	1.690	2.030	2.342	2.724	2.996	3.591
40	0.681	0.851	1.303	1.684	2.021	2.329	2.704	2.971	3.551
45	0.680	0.850	1.301	1.680	2.014	2.319	2.690	2.952	3.520
50	0.680	0.849	1.299	1.680	2.008	2.310	2.678	2.937	3.496
55	0.679	0.849	1.297	1.673	2.004	2.304	2.669	2.925	3.476

ภาคผนวก ง

ตัวอย่างการคำนวณ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตาราง ง.1 สมการความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linear regression) ระหว่างอัตราส่วนของส่วนประกอบในส่วนผสมหลักกับคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านต่าง ๆ

สมการความสัมพันธ์	R^2
สีของผลิตภัณฑ์ก่อนการทำให้สุก = 1.778(M) + 3.311(F) – 6.471(M)(F)	0.9900
สีของผลิตภัณฑ์ก่อนการทำให้สุก = 1.897(M) + 3.082(R) – 6.490(M)(R)	0.9940
สีของผลิตภัณฑ์ก่อนการทำให้สุก = 3.962(F) + 3.266(R) – 14.141(F)(R)	0.9950
สีของผลิตภัณฑ์หลังการทำให้สุก = 1.627(M) + 2.604(F) – 3.746(M)(F)	0.9880
สีของผลิตภัณฑ์หลังการทำให้สุก = 2.320(M) + 3.618(R) – 8.850(M)(R)	0.9910
สีของผลิตภัณฑ์หลังการทำให้สุก = 4.513(F) + 3.326(R) – 15.661(F)(R)	0.9890
รสเค็ม = 1.751(M) + 2.795(F) – 5.213(M)(F)	0.9980
รสเค็ม = 2.088(M) + 2.877(R) – 6.756(M)(R)	0.9970
รสเค็ม = 4.266(F) + 3.249(R) – 15.300(F)(R)	0.9890
รสเปรี้ยว = 1.801(M) + 3.231(F) – 7.392(M)(F)	0.9999
รสเปรี้ยว = 1.771(M) + 2.540(R) – 5.641(M)(R)	0.9990
รสเปรี้ยว = 3.366(F) + 2.862(R) – 12.050(F)(R)	0.9790
กลิ่นเปรี้ยว = 1.960(M) + 3.199(F) – 1.062(M)(F)	0.9980
กลิ่นเปรี้ยว = 1.956(M) + 2.646(R) – 5.760(M)(R)	0.9990
กลิ่นเปรี้ยว = 3.971(F) + 3.352(R) – 14.769(F)(R)	0.9830
ความเหนียว = 1.730(M) + 2.405(F) – 4.751(M)(F)	0.9970
ความเหนียว = 2.026(M) + 2.577(R) – 6.273(M)(R)	0.9990
ความเหนียว = 3.996(F) + 3.156(R) – 14.821(F)(R)	0.9780
ความฉ่ำน้ำ = 2.178(M) + 5.610(F) – 12.212(M)(F)	0.9910
ความฉ่ำน้ำ = 2.025(M) + 4.445(R) – 8.994(M)(R)	0.9950
ความฉ่ำน้ำ = 3.570(F) + 3.275(R) – 10.854(F)(R)	0.9970

ตัวอย่าง ง.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของส่วนประกอบในส่วนผสมหลัก

นำข้อมูลคุณภาพทางประสาทสัมผัสมาหาความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linear regression) ระหว่างอัตราส่วนของส่วนประกอบในส่วนผสมหลักที่ใช้ในแต่ละสิ่งทดลองกับคุณภาพทางประสาทสัมผัสต่าง ๆ โดยทำการหาความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพทางประสาทสัมผัสแต่ละด้านกับส่วนประกอบในส่วนผสมหลักครั้งละสองปัจจัย รวมทั้งอิทธิพลร่วม (Interaction) ของสองปัจจัยดังกล่าวด้วย สมการที่ได้จะเป็นสมการที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังนี้

ยกตัวอย่างรสเปรี้ยว

รสเปรี้ยว = 1.801(M) + 3.231(F) – 7.392(M)(F) R^2= 0.9990 ---- (1)

รสเปรี้ยว = 1.771(M) + 2.540(R) – 5.641(M)(R) R^2= 0.9990 ---- (2)

รสเปรี้ยว = 3.366(F) + 2.862(R) – 12.050(F)(R) R^2= 0.9790 ---- (3)

เมื่อ M คือ เนื้อหมู
F คือ มันแข็ง
R คือ ข้าวเหนียว

สมการทั้ง 3 สมการจะนำมาทำ Partial derivatives โดยจะทำเทียบกับตัวแปรที่ปรากฏในสมการ ดังนั้นแต่ละสมการจะทำ Partial derivatives ได้ 2 ครั้ง ดังนี้

สมการ (1) รสเปรี้ยว = 1.801(M) + 3.231(F) – 7.392(M)(F)
ทำ Partial derivatives ได้สมการ

$$\frac{\delta \text{ รสเปรี้ยว}}{\delta \text{ (M)}} = 0 = 1.801 - 7.392(F) \quad \text{---------- (1.1)}$$

$$\frac{\delta \text{ รสเปรี้ยว}}{\delta \text{ (F)}} = 0 = 3.231 - 7.392(M) \quad \text{---------- (1.2)}$$

สมการ (2) และ (3) นำมาทำ Partial derivatives เช่นเดียวกันได้สมการดังนี้

$$0 = 1.771 - 5.641(R) \quad \text{---------- (2.1)}$$

$$0 = 2.540 - 5.641(M) \quad \text{---------- (2.2)}$$

$$0 = 3.366 - 12.050(R) \quad \text{---------- (3.1)}$$

$$0 = 2.862 - 12.050(F) \quad \text{---------- (3.2)}$$

จากนั้นนำสมการ (1.1) ถึง (3.2) มาลบด้วยค่า Lag range (λ) ดังนี้

$$7.392(F) - \lambda = 1.801 \quad \text{---------- (1.1.1)}$$

$$7.392(M) - \lambda = 3.231 \quad \text{---------- (1.2.1)}$$

$$5.641(R) - \lambda = 1.771 \quad \text{---------- (2.1.1)}$$

$$5.641(M) - \lambda = 2.540 \quad \text{---------- (2.2.1)}$$

$$12.050(R) - \lambda = 3.366 \quad \text{---------- (3.1.1)}$$

$$12.050(F) - \lambda = 2.862 \quad \text{---------- (3.2.1)}$$

นำสมการที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมเชิงเส้น (POM) เพื่อหาอัตราส่วนของส่วนผสมหลักที่เหมาะสมสำหรับลักษณะรสเปรี้ยว โดยอัตราส่วนดังกล่าวจะต้องอยู่ภายใต้ข้อจำกัดที่กำหนด (Constrains) คือ

$$0.35 \leq M \leq 0.80$$

$$0.15 \leq F \leq 0.35$$

$$0.20 \leq R \leq 0.40$$

$$M + F + R = 1.00$$

จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมเชิงเส้น (POM) พบว่า อัตราส่วนของส่วนประกอบในส่วนผสมหลักที่เหมาะสมสำหรับรสเปรี้ยวคือ เนื้อหมูร้อยละ 45.33 มันแข็งร้อยละ 24.87 และข้าวเหนียวร้อยละ 29.80

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์คุณภาพ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

การวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ตามวิธีของ AOAC (2000)

ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยว 10 กรัม ปั่นกับน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่างด้วยเครื่อง Microprocessor pH-meter โดยก่อนวัดต้องปรับค่ามาตรฐานในการวัดแต่ละครั้งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานที่มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 4.00 และ 7.00 ตามลำดับ ทำการวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่างของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแลคติค ตามวิธีของ AOAC (2000)

การเตรียมสารเคมี

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรโดยใช้ขวดปรับปริมาตร

วิธีวิเคราะห์

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยว 10 กรัม ปั่นผสมกับน้ำกลั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ขวดปรับปริมาตร นำตัวอย่างที่เตรียมได้มากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นปิเปตสารละลายใสที่ได้ 10 มิลลิลิตรลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ โดยใช้ฟีนอฟธาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ คำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดโดยคิดเทียบจากค่ามาตรฐานดังนี้

1 มิลลิลิตร ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ ทำปฏิกิริยาสมมูลย์พอดีกับกรดแลคติค 0.009 กรัม

การวิเคราะห์ปริมาณโปแตสเซียมซอร์เบทในรูปกรดซอร์บิค ตามวิธีของ AOAC (2000)

การเตรียมสารเคมี

- สารละลายกรดเมตาฟอสฟอริก

ละลายกรดเมตาฟอสฟอริก 5 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตรด้วยเอธิลแอลกอล์

- สารละลายผสม

ผสมปิโตรเลียมอีเธอร์และไดเอธิลอีเทอร์ ในอัตราส่วน 1 : 1

- โซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ

การเตรียมกราฟมาตรฐานของโปแตสเซียมซอร์เบท

ชั่งโปแตสเซียมซอร์เบท 0.134 กรัม นำมาเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ดูดสารละลายที่ได้ดังกล่าว 1 2 3 4 5 6 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ด้วยสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริก ผสมให้เข้ากันแล้วดูดสารละลายในแต่ละขวดมา 5 มิลลิลิตร ใส่ในกรวยแยกขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายผสม 100 มิลลิลิตร เขย่านาน 1 นาที ตั้งให้แยกชั้น เก็บของชั้นของอีเธอร์ไว้ แล้วทำให้แห้งด้วยโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ 5 กรัม รินสารละลายส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 250 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกรดซอร์บิค (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของอีเธอร์) กับค่าการดูดกลืนแสง

การเตรียม Blank

เตรียมสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริก 5 มิลลิลิตร เติมสารละลายอื่น ๆ เหมือนการเตรียมสารละลายมาตรฐานของโปแตสเซียมซอร์เบท

วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปแตสเซียมซอร์เบทในรูปกรดซอร์บิค

ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยว 10 กรัม (ควรทำ Blank ควบคู่ไปด้วย) ปั่นกับสารละลายกรดฟอสฟอริก 100 มิลลิลิตร นาน 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำไปกรองด้วย

กระดาษกรองเบอร์ 4 ปิเปตของเหลวที่ได้จากการกรองปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในกรวยแยก จากนั้นเติมสารละลายผสม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยก เขย่าสารละลายในกรวยแยก นาน 1 นาที เก็บชั้นของอีเธอร์ (ชั้นบน) ไว้ เติมโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ จำนวน 5 กรัม ลงไปเพื่อดูดความชื้น รินสารละลายส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 250 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ AOAC (2000)

การเตรียมสารเคมี

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 50

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 กรัม ด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

- สารละลายกรดบอริก ความเข้มข้นร้อยละ 2

ละลายกรดบอริก 2 กรัม ด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรโดยใช้ขวดปรับปริมาตร

- สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น
- สารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐาน ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล
- สารละลายเมธิลเรดอินดิเคเตอร์

ละลายเมธิลเรด 0.016 กรัม และบรอมโมครีซอลกรีน 0.083 กรัม ด้วยเอธานอล แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

- คะตะลิสต์ผสม (Catalyst mixture)

ชั่งโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ 96 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟต 3.5 กรัม และซิลิเนียมไดออกไซด์ 0.5 กรัม ผสมให้เข้ากัน

วิธีวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวที่บดละเอียดแล้วประมาณ 0.5-2.0 กรัม (ต้องทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ใน Kjeldahl digestion flask พร้อมด้วยคะตะลิสต์ผสม 8 กรัม และ

กรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร นำไปย่อยด้วยความร้อนโดยใช้ชุดย่อยโปรตีน (Digestion unit) ทำการย่อยตัวอย่างจนได้สารละลายใส

2. ตั้งทิ้งไว้จนเย็นและไม่มีไอระเหยของกรด จากนั้นนำ Kjeldahl digestion flask ไปต่อกับชุดกลั่นโปรตีน (Distillation apparatus) นำฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตรที่มีสารละลายกรดบอริก 50 มิลลิลิตร และเมธิลเรด 2-3 หยด เพื่อใช้เป็นอินดิเคเตอร์มารองรับที่ปลาย Condenser โดยให้ปลาย Condenser อยู่ต่ำกว่าระดับของสารละลาย

3. เติมน้ำกลั่นปริมาณ 125 มิลลิลิตร ลงใน Kjeldahl digestion flask จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 75 มิลลิลิตร จากนั้นจึงทำการกลั่นด้วยความร้อน จะได้ของเหลวที่ควบแน่นลงมาทาง Condenser อย่างน้อย 300 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นชะปลาย Condenser ลงมาในฟลาสก์ และนำสารละลายทั้งหมดไปไตเตรตกับสารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐานความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนถึงจุดยุติที่สารละลายเป็นสีส้มแดง

4. บันทึกปริมาตรสารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐานที่ใช้ในการไตเตรต นำไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Crude protein)

5. ทำการวิเคราะห์ Blank โดยวิธีเดียวกับตัวอย่าง แต่ใช้เพียงคะตะลิสต์ผสมกับกรดซัลฟูริกเข้มข้นเท่านั้น

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละของน้ำหนัก)} = \frac{(V_a - V_b) * C * 1.4007}{W}$$

โดยที่ V_a คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง(มิลลิลิตร)

V_b คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ในการไตเตรต Blank (มิลลิลิตร)

C คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก (นอร์มัล)

W คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละของน้ำหนัก)} = \text{ปริมาณไนโตรเจน} * \text{Factor}$$

โดย Factor ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวในการทดลองนี้เท่ากับ 6.25

การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ตามวิธีของ AOAC (2000)

1. นำกระป๋องอลูมิเนียมของเครื่องสกัดไขมัน (Soxhlet extraction apparatus) ไปอบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 100±2 องศาเซลเซียส แล้วปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักของกระป๋องอลูมิเนียม

2. ชั่งตัวอย่างแห้งผลิตภัณฑ์ใส้กรอกเปรี้ยวที่ได้ผ่านการหาความชื้นมาเรียบร้อยแล้วประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในกระดาษกรองแล้วห่อลงใน Thimble

3. นำ Thimble ใส่ลงในกระป๋องอลูมิเนียมสำหรับสกัดไขมัน สวมหัวยึดที่เป็นโลหะกับส่วนบนของ Thimble แล้วนำไปติดกับตัวยึด Thimble ที่เป็นแม่เหล็กของเครื่องสกัดไขมัน แล้วสกัดไขมันด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ที่มีจุดเดือด 40-60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 150-200 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการสกัดประมาณ 2 ชั่วโมง

4. ถอด Thimble ที่มีห่อกระดาษกรองออกจากเครื่องสกัดไขมัน แล้วนำกระป๋องอลูมิเนียมที่มีไขมันที่สกัดได้อยู่ภายใน ไปอบที่อุณหภูมิ 100±2 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที หรือจนน้ำหนักคงที่ นำกระป๋องอลูมิเนียมไปทำให้เย็นในโถดูดความชื้น บันทึกน้ำหนักของไขมันที่สกัดได้ แล้วคำนวณหาปริมาณไขมันดังนี้

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{A * 100}{B}$$

โดยที่ A คือ น้ำหนักไขมันที่สกัดได้ (กรัม)

B คือ น้ำหนักตัวอย่างแห้งที่นำมาวิเคราะห์ไขมัน รวมน้ำหนักความชื้น (กรัม)

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing sugars) ก่อนและหลังอินเวอร์ชัน ตามวิธีของ Lane and Eynon (AOAC, 2000)

การเตรียมสารเคมี

- สารละลาย Fehling's no.1

ละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate pentahydrate : $CuSO_4.5H_2O$) จำนวน 34.639 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรโดยใช้ขวดปรับปริมาตร

- สารละลาย Fehling's no.2

ละลายโซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตรท (Sodium potassium tartrate หรือ rochelle salt : $KnaC_4O_6.\ 4H_2O$) จำนวน 173 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) จำนวน 50 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรโดยใช้ขวดปรับปริมาตร

- สารละลาย Carrez I

ละลาย Zinc acetate dihydrate 21.9 กรัม ในน้ำกลั่นที่มีกรดอะซิติกเข้มข้น 3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

- สารละลาย Carrez II

ละลายโปแตสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ 10.6 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

- สารละลายเมธิลีนบลูเข้มข้นร้อยละ 1

ละลายเมธิลีนบลู 1 กรัม ด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรโดยใช้ขวดปรับปริมาตร

วิธีวิเคราะห์

การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์ก่อนอินเวอร์ชัน (D_1)

เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยว 37.5 กรัม ปั่นกับน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน ถ่ายของเหลวที่ได้ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร เติม Clearing agent หรือสารละลาย Correz I และ Correz II อย่างละ 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที จากนั้นนำไปกรอง เก็บสารละลายใสที่กรองได้ไว้ใช้วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ก่อนอินเวอร์ชัน (D_1)

Preliminary titration

นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่ในบิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร (ชนิดปลายงอ) ไล่ฟองอากาศออกให้หมด ปิเปตสารละลาย Fehling reagent ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย Fehling no.1 และ Fehling no.2 อย่างละ 5 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ใส่ลูกแก้ว

ขนาดเล็กลงไปประมาณ 2-3 เม็ด นำไปต้มให้เดือดบนตะเกียงบุนเซน ไตเตรตกับสารละลายน้ำตาลตัวอย่างจนสีน้ำเงินจางลง หยดสารละลายเมธิลีนบลูลงไป 1-2 หยด ไตเตรตจนสีฟ้าจางหายไปหมดเหลือแต่ตะกอนสีส้มแดง จดปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ

Accurate titration

ปิเปตสารละลาย Fehling reagent ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย Fehling no.1 และ Fehling no.2 อย่างละ 5 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ใส่ลูกแก้วขนาดเล็กลงไป 2-3 เม็ด เติมสารละลายน้ำตาลจากบิวเรตลงไปทันที โดยใช้ปริมาตรน้อยกว่าที่ใช้ในการไตเตรตครั้งแรกประมาณ 1-2 มิลลิลิตร ปล่อยให้เดือดนาน 2 นาที หยดสารละลายเมธิลีนบลูลงไป 1-2 หยด แล้วไตเตรตต่อจนสีฟ้าหายไปหมด โดยไตเตรตให้เสร็จภายในเวลา 3 นาที ตั้งแต่เริ่มเดือด จดปริมาตรสารละลายน้ำตาลที่ใช้ ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์หลังอินเวอร์ชัน (D_2)

นำสารละลายน้ำตาลที่เหลือจากการไตเตรตหาน้ำตาลรีดิวส์ก่อนอินเวอร์ชันปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดเกลือความเข้มข้น 6.34 นอร์มัล จำนวน 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นานประมาณ 10 นาที ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วปรับปริมาตรส่วนผสมทั้งหมดให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 โมล่าร์ แล้วนำสารละลายที่ได้ไปปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร แล้วทำการไตเตรตเช่นเดียวกับการหาน้ำตาลรีดิวส์ก่อนอินเวอร์ชัน

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ก่อนและหลังอินเวอร์ชันแล้ว สามารถหาปริมาณน้ำตาลซูโครสได้ดังนี้

ร้อยละของน้ำตาลซูโครส = ร้อยละของผลต่าง $(D_2 - D_1) * 0.95$

โดยที่ D_1 เท่ากับ ร้อยละของน้ำตาลรีดิวส์ทั้งหมดก่อนทำการอินเวอร์ชัน

D_2 เท่ากับ ร้อยละของน้ำตาลรีดิวส์ทั้งหมดหลังทำการอินเวอร์ชัน

การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า ตามวิธีของ AOAC (200O)

ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ประมาณ 2-3 กรัม ใส่ลงในถ้วยกระเบื้องเคลือบที่ผ่านการเผาและทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว นำไปเผาโดยใช้ตะเกียงบุนเซนจนไม่มีควัน จากนั้นนำไปเผาต่อในเตาเผา (muffle furnace) อุณหภูมิประมาณ 500 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้เถ้าสีขาว นำไปทำให้เย็นลงในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักเถ้าแล้วคำนวณหาปริมาณเถ้า ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (กรัม ต่อ 100 กรัมของตัวอย่าง)} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้า (กรัม)} * 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

การวิเคราะห์ปริมาณกากโดยวิธีการย่อยด้วยกรดและด่าง ตามวิธีของ AOAC (2000)

การเตรียมสารเคมี

- สารละลายกรดซัลฟูริก ความเข้มข้นร้อยละ 1.25
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1.25
- เอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 95

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวที่ผ่านการสกัดไขมันออกและอบเรียบร้อยแล้วให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน (W1) ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร เติมสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 1.25 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ลูกแก้วขนาดเล็กประมาณ 2-3 เม็ด ต้มบนเตาไฟฟ้าโดยปิดปากบีกเกอร์ด้วยกระจกนาฬิกา

2. ทิ้งให้เดือด 30 นาที (ควรปิดปากฟลาสค์ด้วยกระจกนาฬิกา พยายามรักษาปริมาตรสารละลาย ถ้าลดลงให้เติมน้ำร้อนให้ปริมาตรเท่าเดิมโดยทำเครื่องหมายไว้) ขณะต้มควรเขย่าฟลาสก์เป็นครั้งคราว

3. เตรียมกรวยกรองชนิดพิเศษ (Buchner funnel) โดยใช้แรงสุญญากาศ กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 54 หรือ 531 ค่อย ๆ เทน้ำเดือดลงใส่ลงในกรวยกรอง ปล่อยทิ้งไว้ให้กรวยกรองร้อน

4. นำสารละลายกรดที่ต้มเดือด 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที เทใส่ในกรวยกรองและกรองกากทั้งหมดให้เสร็จภายใน 10 นาที ล้างกากด้วยน้ำร้อนหลาย ๆ ครั้ง จนแน่ใจว่าไม่มีกรดเหลืออยู่ในกาก เทกากที่ล้างแล้วนี้ กลับลงฟลาสก์ใบเดิม

5. ใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1.25 จำนวน 200 มิลลิลิตร ล้างกากออกจากกระดาษกรองใส่ลงฟลาสก์ให้หมด ต้มให้เดือดภายใน 1 นาที และปล่อยให้เดือด 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองโดยใช้แรงสุญญากาศ ให้เสร็จภายใน 10 นาที (เหมือนข้อ 4.) ล้างด้วยน้ำร้อนจนแน่ใจว่าไม่มีด่างเหลืออยู่ เทกากที่ล้างแล้วนี้ กลับลงฟลาสก์ใบเดิม

6. นำกากไปล้างด้วยเอธิลแอลกอฮอล์อีก 2 ครั้ง และนำกากที่เหลือทั้งหมดใส่ลงบนกระดาษกรองชนิดปราศจากเถ้า หรือ Porcelain dish (ที่ผ่านการอบและทราบน้ำหนัก) นำไประเหยให้แห้งบนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

7. นำไปอบต่อที่ 100±2 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก (W2)

8.เผาถ้วยกระเบื้องพร้อมกากที่อบเรียบร้อยแล้วในเตาเผา อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก (W3)

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณกาก (ร้อยละของน้ำหนัก)} = \frac{(W2 - W3)\,(100 - MC - F)}{W1}$$

โดยที่ W1 คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

W2 คือ น้ำหนักถ้วยกระเบื้องและกากหลังจากอบแห้ง (กรัม)

W3 คือ น้ำหนักถ้วยกระเบื้องและกากหลังจากการเผา (กรัม)

MC คือ ปริมาณความชื้นของตัวอย่าง (กรัม)

F คือ ปริมาณไขมันของตัวอย่าง (กรัม)

การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

การวัดค่าสีในระบบ Hunter Lab (Minolta Camera Co.,Ltd. , 1991)

เป็นการวัดสีด้วยเครื่องวัดสี Minolta Camera : Model CR-310 ซึ่งวัดค่าสีในระบบ Hunter Lab โดยค่าสี L เป็นความสว่าง (Lightness) ค่าสี a เป็นค่าสีแดงและเขียว (Redness/Greeness) และค่าสี b เป็นค่าสีเหลืองและน้ำเงิน (Yellowness/Blueness)

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

ก่อนการวัดค่าสีทุกครั้งต้องทำการปรับมาตรฐานเครื่อง (Calibration) โดยใช้แผ่นสีขาวมาตรฐาน (White blank ; L = 97.67, a = -0.18 และ b = 1.84) แล้วจึงทำการวัดสีของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยว โดยนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวที่ผ่านการบดละเอียดแล้วใส่ลงในภาชนะใส (Petri dish) แล้วรองด้วยกระดาษสีขาว ทำการวัดทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

การวัดลักษณะเนื้อสัมผัส (ค่าแรงเฉือน หรือ Shear force) ด้วยเครื่อง Instron (Series 5565) (Instron Corporation, 1993)

เป็นการวัดลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหารโดยใช้ค่าแรงเฉือน หรือ Shear force (นิวตัน) ด้วยเครื่อง Instron series 5565 ชนิดของใบมีดที่ใช้ คือ Warner Bratzler Meat Shear-Compression (2830-013) น้ำหนัก Load cell เท่ากับ 5 กิโลกรัม ความเร็วของ Crosshead เท่ากับ 200 มิลลิเมตรต่อนาที ระยะทางในการเคลื่อนที่ลงทั้งหมดเท่ากับ 5 เซนติเมตร และมีแรงกระทบกลับร้อยละ 60

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ทำการทดสอบเป็นผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวที่ผ่านการอบให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 180-200 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ตัวอย่างทั้งหมดควรมีขนาดเท่ากัน ในการทดลองนี้พื้นที่หน้าตัดของตัวอย่างที่ทำการวัดทั้งหมดจะเท่ากับขนาดของไส้บรรจุที่ใช้ในการผลิต ซึ่งถือว่าเท่ากันหมด ก่อนวัดทุกครั้งต้องทำการปรับมาตรฐานเครื่อง (Calibration) และเพื่อป้องกันความคลาดเคลื่อนของผลการทดลองอันเนื่องจากลักษณะเนื้อของตัวอย่างไม่เป็นเนื้อเดียวกัน จึงทำการวัดทั้งหมด 5 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา

การหาปริมาณยีสต์และรา ตามวิธีของ AOAC (2000)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

- จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- หลอดทดลอง (Test tube)
- ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- ตู้บ่มเชื้อ
- หม้อนึ่งความดัน

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

- สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar
- สารละลายกรดทาร์ทาริก ความเข้มข้นร้อยละ 10

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มจนเดือด
2. นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ในหม้อนึ่งความดัน

3. ปรับอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวให้มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างประมาณ 3.5 ด้วยสารละลายกรดทาร์ทาริก ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยมีอัตราส่วน อาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร ต่อสารละลายกรดทาร์ทาริก 1.8 มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 ใช้กรรไกรและปากคีบที่ปราศจากเชื้อ โดยการลดไฟและเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ ตัดตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวจากบริเวณต่าง ๆ มาผสมกัน ชั่งน้ำหนักให้ได้ 10 กรัม ใส่ในถุงตีบด (Stomacher bag) ที่มีสารลายลายบัฟเฟอร์เปปโตน 90 มิลลิลิตร ผสมอยู่ นำไปตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร (Stomacher) เป็นเวลา 2 นาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:10 หรือ (10^{-1})

1.2 เขย่าให้อาหารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1:10 (10^{-1}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมแบบหมุนวน (Vortex) จะได้อาหารที่เจือจาง 1:100 (10^{-2})

1.3 ทำให้อาหารตัวอย่างมีความเจือจาง 1:1000 (10^{-3}) ด้วยวิธีตามข้อ 1.2

2. การใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดูดสารละลายตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจางต่าง ๆ (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}) ลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางละ 2 จาน โดยเริ่มดูดจากระดับความเข้มข้นที่เจือจางสุด

2.2 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar ที่กำลังหลอมเหลวลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่าง โดยใส่ลงในจานละประมาณ 15-20 มิลลิลิตร ให้เสร็จภายในเวลา 1-2 นาที หลังจากที่ใส่ตัวอย่างลงไปแล้ว

2.3 ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันดี วางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัวจึงคว่ำจานเพาะเชื้อลง

2.4 ทำตัวอย่างควบคุม โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 1 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่างอาหาร

3. การบ่มเชื้อ

บ่มจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้เสร็จเรียบร้อยแล้วที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72±3 ชั่วโมง

4. การตรวจนับจำนวนโคโลนีและการรายงานผล

หลังจากบ่มเชื้อตามกำหนดเวลาแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 1-300 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากทั้งสองจานเพาะเชื้อ รายงานผลการตรวจนับในรูปโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม

การหาปริมาณแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดแลคติคได้ ตามวิธีของ AOAC (2000)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

- จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- หลอดทดลอง (Test tube)
- ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- ตู้บ่มเชื้อ
- หม้อนึ่งความดัน

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

- สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Lactobacilli MRS broth

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 55 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มจนเดือด
2. นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ในหม้อนึ่งความดัน

วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 ใช้กรรไกรและปากคีบที่ปราศจากเชื้อ โดยการลดไฟและเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ ตัดตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวจากบริเวณต่าง ๆ มาผสมกัน ชั่งน้ำหนักให้ได้ 10 กรัม ใส่ในถุงตีบด (Stomacher bag) ที่มีสารลายลายบัฟเฟอร์เปปโตน 90 มิลลิลิตร ผสมอยู่ นำไปตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร (Stomacher) เป็นเวลา 2 นาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:10 หรือ (10^{-1})

1.2 เขย่าให้อาหารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1:10 (10^{-1}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมแบบหมุนวน (Vortex) จะได้อาหารที่เจือจาง 1:100 (10^{-2})

1.3 ทำให้อาหารตัวอย่างมีความเจือจาง 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9} และ 10^{-10} ด้วยวิธีตามข้อ 1.2

2. การใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดูดสารละลายตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจางต่าง ๆ (10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9} และ 10^{-10}) ลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางละ 2 จาน โดยเริ่มดูดจากระดับความเข้มข้นที่เจือจางสุด

2.2 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Lactobacilli MRS broth ที่กำลังหลอมเหลวลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่าง โดยใส่ลงในจานละประมาณ 15-20 มิลลิลิตร ให้เสร็จภายในเวลา 1-2 นาที หลังจากที่ใส่ตัวอย่างลงไปแล้ว

2.3 ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันดี วางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัวจึงคว่ำจานเพาะเชื้อลง

2.4 ทำตัวอย่างควบคุม โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 1 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่างอาหาร

3. การบ่มเชื้อ

บ่มจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้เสร็จเรียบร้อยแล้วที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24±3 ชั่วโมง

4. การตรวจนับจำนวนโคโลนีและการรายงานผล

หลังจากบ่มเชื้อตามกำหนดเวลาแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากทั้งสองจานเพาะเชื้อ รายงานผลการตรวจนับในรูปโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม

การวิเคราะห์หา *Staphylococcus aureus* ตามวิธีของ AOAC (2000)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

- จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- ตู้บ่มเชื้อ
- หม้อนึ่งความดัน

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

- สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Single strength trypticase soy broth
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Double strength trypticase soy broth
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Baird parker agar
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain heart infusion broth

วิธีวิเคราะห์

1. ใช้กรรไกรและปากคีบที่ปราศจากเชื้อ โดยการลดไฟและเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ ตัดตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวจากบริเวณต่าง ๆ มาผสมกัน ชั่งน้ำหนักให้ได้ 10 กรัม ใส่ในถุงตีบด (Stomacher bag) ที่มีสารลายลายบัฟเฟอร์เปปโตน 90 มิลลิลิตร ผสมอยู่ นำไปตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร (Stomacher) เป็นเวลา 2 นาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:10 หรือ (10^{-1})

2. ปิเปตตัวอย่างอาหารที่มีระดับความเจือจาง 1:10 หรือ (10^{-1}) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดอาหาร Double strength trypticase soy broth 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี บ่มที่

อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม Single strength trypticase soy broth ที่มีเกลือ (Sodium chloride) ความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงไปผสมเขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน บ่มต่อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 24±2 ชั่วโมง

3. Spread plate ตัวอย่างอาหารที่ได้จากข้อ 2. ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บนผิวหน้าแห้งของอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird parker agar จำนวน 2 จาน ปล่อยให้สารละลายแห้งดีแล้วจึงคว่ำจาน บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 48±2 ชั่วโมง

4. สังเกตโคโลนีที่มีลักษณะสีดำเป็นมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3-0.5 มิลลิเมตร มีบริเวณใสล้อมรอบ ให้ถ่ายเชื้อจำนวน ≥2 โคโลนี เลี้ยงในอาหาร Brain heart infusion broth บ่มที่ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง

5. ยืนยันผลโดยทดสอบ Coagulase

6. รายงานผลการพบเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในอาหารจำนวน 10 กรัม หรือไม่พบเชื้อในอาหารจำนวน 10 กรัม

การวิเคราะห์หา *Salmonella* ตามวิธีของ AOAC (2000)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

- จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- หลอดทดลอง (Test tube)
- ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- ตู้บ่มเชื้อ
- หม้อนึ่งความดัน

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

- สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Tetrathionate broth
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Selenite cystine broth
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Bismuth sulfate
- อาหารเลี้ยงเชื้อ XLD agar
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant-green phenol-red lactose sucrose agar

วิธีวิเคราะห์

1. ใช้กรรไกรและปากคีบที่ปราศจากเชื้อ โดยการลดไฟและเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ ตัดตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวจากบริเวณต่าง ๆ มาผสมกัน ชั่งน้ำหนักให้ได้ 25 กรัม ใส่ในถุงตีบด (Stomacher bag) ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 225 มิลลิลิตร ผสมอยู่ นำไปตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร (Stomacher) เป็นเวลา 2 นาที บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2. ปิเปตสารละลายจากข้อ 1. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้

- ปิเปตสารละลายจากข้อ 1. ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tetrathionate broth 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24±2 ชั่วโมง
- ปิเปตสารละลายจากข้อ 1. ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Selenite cystine broth 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24±2 ชั่วโมง

3. ทำการแยกเชื้อดังนี้

- ใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop) ถ่ายเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ Tetrathionate broth ลงในผิวหน้าแห้งของอาหารเลี้ยงเชื้อ Bismuth sulfate, XLD agar และ Brilliant-green phenol-red lactose sucrose agar
- ใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop) ถ่ายเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ Selenite cystine broth ลงในผิวหน้าแห้งของอาหารเลี้ยงเชื้อ Bismuth sulfate, XLD agar และ Brilliant-green phenol-red lactose sucrose agar

4. บ่มจานเพาะเชื้อทั้งหมดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24±2 ชั่วโมง สังเกตลักษณะของโคโลนีดังนี้

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Bismuth sulfate : ลักษณะเฉพาะของโคโลนี *Salmonella* คือ เป็นโคโลนีสีดำ มีหรือไม่มีสีเลื่อมมันอมเขียวสะท้อนแสง (Metallic sheen) พื้นอาหารรอบ ๆ โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ (Halo effect) ซึ่งถ้าบ่มนานขึ้นจะยิ่งเห็นสีชัดเจนขึ้น ถ้าหลังจากบ่มนาน 24±2 ชั่วโมง แล้วไม่พบโคโลนีเกิดขึ้นเลยให้บ่มต่ออีก 24±2 ชั่วโมง
- อาหารเลี้ยงเชื้อ XLD agar : ลักษณะเฉพาะของโคโลนี *Salmonella* คือ เป็นโคโลนีสีชมพู มีหรือไม่มีสีดำตรงกลางของโคโลนีเลยก็ได้

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant-green phenol-red lactose sucrose agar : ลักษณะเฉพาะของโคโลนี Salmonella คือ เป็นโคโลนีสีชมพู พื้นอาหารรอบ ๆ โคโลนีเป็นสีแดง

5. ทำการยืนยันผล โดยการทดสอบทางชีวเคมี

- Triple sugar iron agar ถ่ายเชื้อจากตรงกลางโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของ *Salmonella* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Triple sugar iron agar โดยการเกลี่ย (Streak) และแทง (Stab) บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24±2 ชั่วโมง เชื้อ *Salmonella* จะให้ผลดังนี้ ผิวหน้าเอียงของอาหารเป็นสีแดง บริเวณที่เป็นรอยแทงเป็นสีเหลือง อาจมีหรือไม่มีสีดำ
- Urea agar ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์จากหลอดอาหาร Triple sugar iron agar ที่ให้ผลบวก (Positive) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Urea agar โดยการเกลี่ยเชื้อลงบนผิวหน้าเอียงของอาหาร บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24±2 ชั่วโมง เชื้อ *Salmonella* จะให้ผลลบ (Negative) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลง

การหาปริมาณโคลิฟอร์มและอี.โคไล (Coliform and *E. coli*) **โดยวิธี** MPN (Most probable number method) **ตามวิธีของ** AOAC (2000)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

- หลอดทดลอง (Test tube) พร้องหลอดดักก๊าซ (Durham tube)
- ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- ตู้บ่มเชื้อ
- หม้อนึ่งความดัน

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

- สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl sulphate broth
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Brillant green lactose bile broth

วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 ใช้กรรไกรและปากคีบที่ปราศจากเชื้อ โดยการลดไฟและเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ ตัดตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวจากบริเวณต่าง ๆ มาผสมกัน ชั่งน้ำหนักให้ได้ 10 กรัม ใส่ในถุงตีบด (Stomacher bag) ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 90 มิลลิลิตร ผสมอยู่ นำไปตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร (Stomacher) เป็นเวลา 2 นาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:10 หรือ (10^{-1})

1.2 เขย่าให้อาหารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1:10 (10^{-1}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมแบบหมุนวน (Vortex) จะได้อาหารที่เจือจาง 1:100 (10^{-2})

2. การวิเคราะห์แบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโคลิฟอร์ม (Presumptive coliforms)

2.1 ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างที่ระดับเจือจางต่าง ๆ (1, 10^{-1} และ 10^{-2}) ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl sulphate broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 ชุด ชุดละ 5 หลอด

ชุดที่ 1 ปิเปตตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 5 หลอด

ชุดที่ 2 ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 5 หลอด

ชุดที่ 3 ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 5 หลอด

2.2 บ่มหลอดเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 37$\pm$1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48$\pm$2 ชั่วโมง หากหลอดทดลองใดมีก๊าซเกิดขึ้นในหลอดดักก๊าซ แสดงว่าให้ผลเป็นบวก (Positive) ซึ่งคาดว่าจะมีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดโคลิฟอร์มเจริญอยู่ในตัวอย่างนั้น ถ้าไม่พบก๊าซในหลอดทดลองใดเลย แสดงว่าให้ผลลบ (Negative) และไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดโคลิฟอร์มเจริญอยู่ในตัวอย่าง

2.3 การรายงานจำนวนโคลิฟอร์มในตัวอย่างที่เกิดก๊าซขึ้น ให้เปิดตารางแมคคราดี แล้วรายงานเป็นจำนวนโคลิฟอร์มแบคทีเรียต่อตัวอย่าง 1 กรัม

3. การยืนยันโคลิฟอร์ม

3.1 ใช้ห่วง (Loop) เขี่ยเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลบวก (Positive) จากการทดสอบแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโคลิฟอร์ม ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue agar ในจานเพาะเชื้อ

3.2 บ่มจานเพาะเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.3 ตรวจหาโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของโคลิฟอร์ม โดยโคโลนีของโคลิฟอร์มจะมีสีดำหรือมีสีดำตรงกลางล้อมรอบด้วยบริเวณที่โปร่งใสไม่มีสี โคลิฟอร์มบางโคโลนีมีลักษณะนูนเปียกเยิ้ม (Mucoid)

3.4 บักทึกจำนวนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชุดที่มีเชื้อจุลินทรีย์โคลิฟอร์มที่ได้รับการยืนยันแล้ว

4. การวิเคราะห์แบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E.coli*

4.1 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle) เขี่ยเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลบวก (Positive) จากการทดสอบแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโคลิฟอร์ม ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Brillant green lactose bile broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อต้องปรับให้มีอุณหภูมิเท่ากับ 44.5 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้

4.2 เขี่ยเชื้อ *E. coli* ซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Brillant green lactose bile broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร อีก 2 หลอด เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุม (Control)

4.3 บ่มหลอดเลี้ยงเชื้อลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 44.5±0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.4 หลอดทดลองที่มีก๊าซเกิดขึ้นหรือให้ผลบวก (Positive) แสดงว่ามีแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็น *E. coli* ให้ทำการวิเคราะห์เพื่อยืนยัน *E. coli*

5. การวิเคราะห์เพื่อยืนยัน *E. coli*

5.1 เขี่ยเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลบวก (Positive) จากการทดสอบแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue agar ในจานเพาะเชื้อ

5.2 บ่มจานเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

5.3 เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *E. coli* ซึ่งมีสีน้ำเงินอมดำตรงกลางและมีสีเลื่อมมันอมเขียวสะท้อนแสงโดยบางครั้งสีเลื่อมมันอาจไม่ปรากฏ เขี่นเชื้อครั้งละ 1 โคโลนีลงใน

น้ำทริปโตน (Tryptone water) แล้วบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 44.5±0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.4 เขี่ยเชื้อ *E. coli* มาตรฐานในหลอดน้ำทริปโตน (Tryptone water) เพื่อเป็นตัวอย่างควบคุม

5.5 ทดสอบสารอินโดล หลอดทดลองที่มีอินโดลเกิดขึ้น แสดงว่าเป็นเชื้อ *E. coli* จากนั้นบันทึกจำนวนหลอดทดลองที่ให้ผลบวก (Positive)

5.6 คำนวณและรายงานค่า MPN ของ Coliform และ *E.coli* ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยว 1 กรัม

5.7 การทดสอบยืนยันเพิ่มเติมเกี่ยวกับ Coliform และ *E.coli* ควรทำการทดสอบเมธิลเรด (Methyl red) โวเกส-พรอสเกาเออร์ (Voges-Proskauer) และซิเตรต (Citrate test) โดยก่อนจะทดสอบปฏิกิริยาเหล่านี้ต้องแยกเชื้อ *E. coli* ให้บริสุทธิ์ก่อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตาราง จ.1 ตารางแมคครา ดี

แสดงความน่าจะเป็นของปริมาณแบคทีเรียที่ได้จากการประเมินโดยวิธีหลอดเจือจาง (Dilution tube method) หรือค่าเอ็มพีเอ็น (Most probable number) ในอาหาร 1 กรัม หรือ 1 มิลลิลิตร เทียบจากหลอดที่ให้ปฏิกิริยาบวก โดย 5 หลอดมีตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 10^{-1} จำนวน 10 มิลลิลิตร อีก 5 หลอด มีตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 10^{-2} และอีก 5 หลอดมีตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 10^{-3} จำนวน 1 มิลลิตร

จำนวนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อและจำนวนตัวอย่างที่เจือจางระดับต่างๆที่เติมในแต่ละหลอด			MPN ของแบคทีเรียต่อกรัมตัวอย่าง	จำนวนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อและจำนวนตัวอย่างที่เจือจางระดับต่างๆที่เติมในแต่ละหลอด			MPN ของแบคทีเรียต่อกรัมตัวอย่าง
5 หลอดที่ 10^{-1} จำนวน 1 มล.	5 หลอดที่ 10^{-2} จำนวน 1 มล.	5 หลอดที่ 10^{-3} จำนวน 1 มล.		5 หลอดที่ 10^{-1} จำนวน 1 มล.	5 หลอดที่ 10^{-2} จำนวน 1 มล.	5 หลอดที่ 10^{-3} จำนวน 1 มล.	
0	0	0	0	3	0	1	11
0	0	1	2	3	0	2	13
0	0	2	4	3	1	0	11
0	1	0	2	3	1	1	14
0	1	1	4	3	1	2	17
0	1	2	6	3	3	3	20
0	2	0	4	3	2	0	14
0	2	1	6	3	2	1	17
0	3	0	6	3	2	2	20
1	0	0	6	3	3	0	17
1	0	1	4	3	3	1	21
1	0	2	6	3	4	2	21
1	0	3	8	3	4	1	24
1	1	0	4	3	5	0	25
1	1	1	6	4	0	0	13
1	1	2	6	4	0	1	17
1	2	0	6	4	0	2	21
1	2	1	8	4	0	3	25
1	2	2	10	4	1	0	17
1	3	0	8	4	0	1	21
1	3	1	10	4	1	2	26
1	4	0	11	4	2	0	22
2	0	0	5	4	2	1	26
2	0	1	7	4	2	2	32

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตาราง จ.1 ตารางแมคคราดี (ต่อ)

จำนวนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อและจำนวนตัวอย่างที่เจือจางระดับต่างๆที่เติมในแต่ละหลอด			MPN ของแบคทีเรียต่อกรัมตัวอย่าง	จำนวนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อและจำนวนตัวอย่างที่เจือจางระดับต่างๆที่เติมในแต่ละหลอด			MPN ของแบคทีเรียต่อกรัมตัวอย่าง
5 หลอดที่ 10^{-1} จำนวน 1 มล.	5 หลอดที่ 10^{-2} จำนวน 1 มล.	5 หลอดที่ 10^{-3} จำนวน 1 มล.		5 หลอดที่ 10^{-1} จำนวน 1 มล.	5 หลอดที่ 10^{-2} จำนวน 1 มล.	5 หลอดที่ 10^{-3} จำนวน 1 มล.	
2	0	2	9	4	3	0	27
2	0	3	12	4	3	1	33
2	1	0	7	4	3	2	39
2	1	1	9	4	4	0	34
2	1	2	12	4	4	1	40
2	2	0	9	4	5	0	41
2	2	1	12	4	5	1	48
2	2	2	14	5	0	0	23
2	3	0	12	5	0	1	31
2	3	1	14	5	3	2	43
2	4	0	15	5	4	3	58
2	0	0	8	5	4	4	76
5	1	0	33	5	4	5	253
5	1	1	46	5	4	0	130
5	1	2	63	5	4	1	172
5	1	3	64	5	4	2	221
5	2	0	49	5	5	3	278
5	2	1	70	5	5	4	345
5	2	2	94	5	5	5	246
5	2	3	120	5	5	0	240
5	2	4	148	5	5	1	348
5	2	5	177	5	5	2	542
5	3	0	79	5	5	3	920
5	3	1	109	5	5	4	1600
5	3	2	141	5	5	5	>1600
5	3	3	175				
5	3	4	212				

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวพันธิตรา พรหมรักษา

วัน เดือน ปี เกิด 8 พฤศจิกายน 2521

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2539 สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย
โรงเรียนอุตรดิตถ์ดรุณี จังหวัดอุตรดิตถ์

พ.ศ. 2543 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ผลงานวิจัย

- ปัญหาพิเศษ เรื่อง การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพจากสาหร่าย Spirulina วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2542
- โครงการวิจัย เรื่อง การพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรแผ่น มูลนิธิโครงการหลวง พ.ศ. 2543-2545

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University