ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์คุณภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและกายภาพ

การวัดค่าวอเตอร์แอคติวิตี (a_w)

วัดค่าด้วยเครื่อง Aqualab LITE (DECAGON, U.S.A.) วิธีการคือ ใส่ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ลงในตลับพลาสติกสำหรับวัดค่า a_w แล้วนำไปใส่เครื่อง Aqualab LITE บันทึกค่า a_w ที่ค่าคงที่ ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

การวัดค่าสีระบบฮันเตอร์

เป็นการวัดค่าสีในรูป ค่าสี L a และ b ในงานวิจัยนี้วัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสี Chroma meter model CR-400 (KONICA MINOLTA, Japan) โดยค่า L คือ ค่าความสว่าง (lightness) มีค่าตั้งแต่ 0 (สีดำ) จนถึง 100 (สีขาว) ถ้ามีค่าสูงแสดงว่าผลิตภัณฑ์นั้นมีสีสว่างมาก ถ้ามีค่าต่ำแสดงว่าผลิตภัณฑ์นั้นมีสีคล้ำหรือค่อนข้างมืด ค่า a ถ้ามีค่าเป็นบวก แสดงว่าผลิตภัณฑ์นั้นมีแนวโน้มไปทางสีแดง (redness) ถ้ามีค่าเป็นลบ แสดงว่าผลิตภัณฑ์นั้นมีแนวโน้มไปทางสีเขียว (greenness) ส่วนค่า b คือ มีค่าเป็นบวก แสดงว่าผลิตภัณฑ์นั้นมีแนวโน้มไปทางสีเหลือง (yellowness) ถ้าเป็นค่าลบ แสดงว่าผลิตภัณฑ์มีแนวโน้มเป็นสีน้ำเงิน (blueness) (Hutchings, 1994)

การวัดค่าความแน่นเนื้อ ; Firmness (Stable Micro Systems Ltd.,)

ในการวัดค่า firmness จะเตรียมตัวอย่างในขวดแก้วมีปริมาณแยมเสาวรสลดพลังงาน 300 มิลลิลิตรเท่ากันทุกตัวอย่างก่อนทำการวัด ในการวัดค่า firmness ใช้เครื่อง TA-XT2 Texture Analyser (Stable Micro System Ltd., UK.) วัดแรงกด (compression) ใช้หัววัดทรงกระบอกขนาดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (DIA cylinder stainless) กดบริเวณตรงกลางตัวอย่าง โดยกดลงไปลึก 20 มิลลิเมตร (pre-test speed: 10 mm/s; test speed: 2 mm/s; post-test speed: 10 mm/s; trigger force: 5 g) ค่า firmness คือ จุดที่วัดแรงกดเป็นบวกสูงที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวัดค่าพลังงานของอาหาร

วัดค่าพลังงานอาหารโดยใช้ Bomb calorimeter (PARR model 1356 Isoperibol calorimeter, USA.) Bomb calorimeter เป็นการศึกษาปฏิกิริยาการเผาไหม้ในภาชนะปิดสนิทที่มีปริมาตรคงที่ ความดันเกิดการเปลี่ยนแปลง และแตกต่างจากบรรยากาศภายนอก ดังนั้น การวัดพลังงานโดยใช้ bomb calorimeter เป็นการวัดผลจากการเปลี่ยนแปลงพลังงานในกระบวนการ ซึ่งจะลดลงไปอยู่ในสภาวะมาตรฐาน และ standard enthalpy

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Lane and Eynon method

อาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของทองแดง (Copper reduction) เนื่องจากในโมเลกุลของน้ำตาลประเภทโมโน และไดแซคคาไรด์ มีหมู่อัลดีไฮด์ หรือ หมู่คีโตน-อิสระ จึงสามารถทำการรีดิวซ์คิวบริกอิออน (CU^{2+}) ในรูปของ $CuSO^4$ ให้เป็นคิวปรัสอิออน (CU^{+}) ในรูปของ Cu_2O ซึ่งได้ตะกอนสีส้มแดง เรียกน้ำตาลประเภทนี้ว่า น้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ส่วนน้ำตาลซูโครสจัดเป็น น้ำตาลนอน-รีดิวซ์ (Non-Reducing sugar) ดังนั้นจะต้องทำการไฮโดรไลซ์ด้วยกรด เพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลอินเวอร์สก่อน จึงสามารถเกิดการรีดิวซ์ทองแดงได้

การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ สามารถทำได้โดยนำไปไตรเตรตกับสารละลายผสมของ Fehling's solution จำนวน 10 ml หรือ 25 ml (Lane and Eynon method)

สารเคมีที่ใช้

1. สารที่ช่วยทำให้ใส (Clearing agents) ประกอบด้วย

- Carrez I ($ZnOAc.2H_2O$ 21.9 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่มี glacial acetic acid 3 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml)
- Carrze II ($K_4Fe(CN)_6.3H_2O$ 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. สารละลาย Fehling's solution : ผสม Fehling's solution A และ B เตรียมทันทีก่อนใช้

- Fehling's solution A ($CuSO_4$. $5H_2O$ 69.28 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร)

- Fehling's solution B (NaOH 100 กรัม, $Na.K.H_4\ O_{6.4}\ H_2O$ (Rochelle salt) 346 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร)

3. Methylene Blue 1% (Methylene Blue 1 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml)

วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมตัวอย่างอาหาร

- ชั่งตัวอย่างอาหารมาจำนวนหนึ่ง (ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาลในอาหาร) เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อยเพื่อที่จะได้ปั่นตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน

- เติม Clearing agents (Carrez I, II) ลงไปอย่างละ 5 ml เขย่าให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml (หรือ 250 ml) ด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนประมาณ 20-30 นาที กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวใส เช่น เครื่องดื่มบรรจุกระป๋อง / ขวด ไม่ต้องทำขั้นตอนนี้

- กรองสารละลายที่ได้ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนอินเวอร์ชัน (BI)

2. การไตเตรต

2.1 Preliminary titration

- นำสารละลายที่กรองได้ ใส่บิวเรตปลายงอ สำหรับหาน้ำตาลโดยวิธีนี้ไล่ฟองอากาศโดยเฉพาะตรงส่วนปลายแท่งแก้วออกให้หมด

- ปิเปตสารละลายผสม Fehling's solution จำนวน 10 ml (ใช้อย่าง 5 ml) หรือ 25 ml (ใช้อย่างละ 12.5 ml) ใส่ในฟลาสก์ เติมลูกแก้วเล็กๆ (glass beads) ลงไป 8-10 เม็ด เพื่อกันการเดือดจนล้นออกมา

- นำไปต้มด้วยตะเกียงบุนเซน จนเดือด แล้วจึงนำไปไตเตรตกับสารละลายน้ำตาลตัวอย่าง จนสีน้ำเงินจางลง ให้หยดเมธิลีนบลูลงไป 2-3 หยด ไตเตรตจนสีฟ้า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หายไปหมดเหลือแต่ตะกอนสีส้มแดงของ CuO_2 บันทึกปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ ทำ 2 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ย

หมายเหตุ :

1. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการไตเตรตกับสารละลายผสม Fehling จะต้องอยู่ในช่วง 15-50 ml เท่านั้น
2. ถ้าปริมาตรที่ใช้ไตเตรตน้อยกว่า 15 ml แสดงว่าสารละลายตัวอย่างเข้มข้นเกินไป จะต้องเจือจางสารละลายตัวอย่างลง
3. ถ้าปริมาตรที่ใช้ไตเตรตมากกว่า 15 ml แสดงว่าสารละลายตัวอย่างเจือจางเกินไป จะต้องเตรียมตัวอย่างใหม่ให้เข้มข้นขึ้นกว่าเดิม

2.2 Accurate titration

- เมื่อได้ความเข้มข้นและปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (15-25 ml) ให้ทำซ้ำเหมือนกับ Preliminary โดยให้เติมสารละลายน้ำตาลตัวอย่างจากบิวเรตลงไปในฟลาสก์ที่กำลังเดือดทันที (ให้น้อยกว่าปริมาตรที่จะใช้ไตเตรตในช่วง Preliminary ประมาณ 2-3 ml)

- ต้มให้เดือด หยดเมธิลีนบลูลงไป 2-3 หยด ไตเตรตต่อให้เสร็จภายใน 3 นาทีตั้งแต่เริ่มเดือดจนสารละลายเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นตะกอนสีส้มแดง (ขณะไตเตรตต้องให้สารละลายเดือดตลอดเวลา)

- ทำซ้ำ 2 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย นำปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ได้ ไปหาปริมาณน้ำตาลในรูปของ invert sugar (หน่วย mg/100 ml) คำนวณหาปริมาณร้อยละของน้ำตาลรีดิวซ์ ก่อนอินเวอร์ชัน (before invertion, D_1) กับน้ำหนักตัวอย่าง (mg) ที่ใช้วิเคราะห์

- การคำนวณ ให้เทียบค่าระหว่างปริมาตรของสารละลายน้ำตาลตัวอย่างที่ใช้ในการไตเตรต (ml) กับปริมาณน้ำตาลในรูปของ invert sugar (mg/100 ml) แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณเทียบกับน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (mg) ใช้วิเคราะห์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังการทำอินเวอร์ชัน (After invertion, D_2)

ถ้าตัวอย่างอาหารมีทั้งน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลซูโครส จะต้องเอาสารละลายตัวอย่างอาหารนั้นไปไฮโดรไลซ์ด้วยสารละลายกรดก่อน เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลอินเวอร์ส (กลูโคส และฟรุกโตส) และหาปริมาณน้ำตาลหลังอินเวอร์ชัน แต่ถ้าตัวอย่างอาหารมีแต่น้ำตาลรีดิวซ์อย่างเดียว หรือมีปริมาณซูโครสน้อยมากๆ เช่น น้ำผึ้งแท้ ก็ไม่ต้องทำขั้นตอนนี้ และถ้าตัวอย่างอาหารมีเฉพาะน้ำตาลซูโครสอย่างเดียวก็หาปริมาณน้ำตาลหลังอินเวอร์ชันได้เลย ไม่ต้องหาน้ำตาลก่อนอินเวอร์ชัน

วิธีการหาปริมาณน้ำตาลหลังการอินเวอร์ชัน

- นำสารละลายตัวอย่างที่เหลือจากการหาน้ำตาลก่อนอินเวอร์ชัน (หรืออาจเตรียมใหม่ก็ได้) ทำการตกตะกอนให้ใสโดนใช้ clearing agent ก่อนปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml
- นำสารละลายที่กรองได้ มาประมาณ 10-20 ml เติม HCl 6.34 N จำนวน 10 ml นำไปอุ่นใน water bath 70 องศาเซลเซียส นาน 0 นาที ทำให้เย็นลงอย่างรวดร็ว ปรับให้เป็นกลางด้วย NaOH 5 N ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml (หรือ 250 ml)
- นำไปไตเตรตกับสารละลาย Fehling (10 หรือ 25 ml) จดปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ ทำ 2 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย
- นำค่าที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาล ในรูป invert sugar จากตาราง คำนวณหาปริมาณในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ภายหลังอินเวอร์ชัน (After invertion, D_2) ซึ่งค่าที่ได้จะเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในตัวอย่างอาหาร รวมกับน้ำตาลอินเวอร์ส
- นำค่าปริมาณน้ำตาลที่ได้ (ทั้งค่า D_1 และ D_2) มาคำนวณหาปริมาณน้ำตาล ดังนี้

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

การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์

การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1) จานเพาะเชื้อ และปิเปตขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร (ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง)
2) เครื่องเจือจางตัวอย่าง (stomacher)
3) เครื่องเขย่า

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

1) สายละลายบัฟเฟอร์เปปโตน เข้มข้นร้อยละ 0.1
2) Plate count agar, PCA

วิธีวิเคราะห์

1) การเตรียมตัวอย่าง

ใช้ช้อนที่ปราศจากเชื้อโดยการลนไฟและเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ ตักตัวอย่างจากหลายๆ ส่วน ชั่งน้ำหนักได้ 25 กรัม ใส่ในถุงตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร (stomacher bag) เป็นเวลา 2 นาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1 : 10 (10^{-1})

เขย่าอาหารให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1 : 10 (10^{-1}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า จะได้อาหารที่เจือจาง 1 : 100 (10^{-2})

ทำให้อาหารมีความเจือจาง 1 : 1000 (10^{-3}) และความเจือจางต่อๆ ไปด้วยวิธีเดียวกันจนถึงความเจือจาง 1 : 1000000 (10^{-6})

2) การใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรดูดสารละลายของตัวอย่างที่ความเจือจางต่างๆ ลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร ความเจือจางละ 2 จาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เทอาหาร PCA ที่กำลังหลอมเหลว (อุณหภูมิไม่ควรสูงกว่า 48 องศาเซลเซียส) ลงในงานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่าง โดยใส่ลงไปจานละประมาณ 15-20 มิลลิลิตร ให้เสร็จภายในเวลา 15 นาที นับตั้งแต่ความเจือจางเริ่มต้น

ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันดี วางทิ้งไว้ให้เย็น แล้วคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อลง

ทำตัวอย่างควบคุม โดยใช้สารละลายเปปโตน 1 มิลลิลิตรแทนสารละลายของตัวอย่างอาหาร

3) การบ่มเชื้อ บ่มจานอาหารที่เตรียมไว้เสร็จเรียบร้อยแล้วที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 72±3 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48±2 ชั่วโมง

4) การตรวจนับจำนวนโคโลนีและการรายงานผล หลังบ่มเชื้อตามกำหนดแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเชื้อ ที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี รายงานผลการตรวจนับว่า มีจำนวน aerobic bacteria ในรูปโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม (cfu/g)

การตรวจนับยีสต์และเชื้อรา

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1) จานเพาะเชื้อ และปิเปตขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร (ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง)

2) เครื่องเจือจางตัวอย่าง (stomacher)

3) เครื่องเขย่า

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

1) สายละลายบัฟเฟอร์เปปโตน เข้มข้นร้อยละ 0.1

2) Potato dextrose agar, PDA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีวิเคราะห์

1) การเตรียมตัวอย่าง

ใช้ช้อนที่ปราศจากเชื้อโดยการลนไฟและเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ ตักตัวอย่างจากหลายๆ ส่วน ชั่งน้ำหนักได้ 25 กรัม ใส่ในถุงตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร (stomacher bag) เป็นเวลา 2 นาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1 : 10 (10^{-1})

เขย่าอาหารให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1 : 10 (10^{-1}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า จะได้อาหารที่เจือจาง 1 : 100 (10^{-2})

ทำให้อาหารมีความเจือจางจนถึง 1 : 1000 (10^{-3}) และความเจือจางต่อๆ ไปด้วยวิธีเดียวกันจนถึงความเจือจาง 1 : 1000000 (10^{-6})

2) การใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายของตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจางต่างๆ ลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร ความเจือจางละ 3 จาน

เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่กำลังหลอมเหลวลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่างโดยใส่ลงไปจานละประมาณ 15-20 มิลลิลิตร รีบเทให้เสร็จภายใน 1 ถึง 2 นาทีหลังจากใส่เชื้อลงไปแล้ว

ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันดี วางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว

ทำตัวอย่างควบคุม โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 1 มิลลิลิตรแทนสารละลายของตัวอย่างอาหาร

การบ่มเชื้อ

บ่มจานอาหารที่เตรียมไว้เสร็จเรียบร้อยแล้วไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 22 ถึง 25 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การตรวจนับจำนวนโคโลนีและการรายงานผล

หลังบ่มเชื้อตามเวลากำหนดแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 10-150 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากทั้ง 3 จานเพาะเชื้อ รายงานผลการตรวจนับในรูปโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม (cfu/g ml)

การหาปริมาณโคลิฟอร์ม (Coliform) และ *Escherichia coli.* โดยวิธี MPN (Most probable number method)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1) หลอดทดลอง (test tube) พร้อมหลอดดักก๊าซ (durham tube)
2) ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
3) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
4) ตู้บ่มเชื้อ
5) หม้อนึ่งความดัน

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

1) สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1
2) อาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl sulphate broth
3) อาหารเลี้ยงเชื้อ Brillant green lactose bile broth

วิธีวิเคราะห์

1) การเตรียมตัวอย่าง

ใช้ช้อนที่ปราศจากเชื้อโดยการลนไฟและเช็ดด้วแอลกอฮอล์ ตักตัวอย่างจากหลายๆ ส่วน ชั่งน้ำหนักได้ 25 กรัม ใส่ในถุงตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร (stomacher bag) เป็นเวลา 2 นาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1 : 10 (10^{-1})

เขย่าอาหารให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1 : 10 (10^{-1}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า จะได้อาหารที่เจือจาง 1 : 100 (10^{-2})

2) การวิเคราะห์แบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโคลิฟอร์ม (presumptive coliforms)

ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างที่ระดับเจือจางต่างๆ (1 :10^{-1} และ 10^{-2}) ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl sulphate broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 ชุด ชุดละ 5 หลอด โดยชุดที่ 1 ปิเปตตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 3 หลอด ชุดที่ 2 ปิเปตตัวอย่างที่ระดับ 10^{-1} จำนวน 1 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลอง 3 หลอด ชุดที่ 3 ปิเปตตัวอย่างที่ระดับ 10^{-2} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 3 หลอด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บ่มหลอดเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48±2 ชั่วโมง หากหลอดทดลองใดมีก๊าซเกิดขึ้นในหลอดดักก๊าซ แสดงว่าให้ผลเป็นบวก (positive) ซึ่งคาดว่าจะมีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดโคลิฟอร์มเจริญอยู่ในตัวอย่างนั้น ถ้าไม่พบก๊าซในหลอดดักก๊าซใดเลย แสดงว่าให้ผลลบ (negative) และไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดโคลิฟอร์มเจริญอยู่ในตัวอย่าง

การรายงานจำนวนโคลิฟอร์มในตัวอย่างที่เกิดก๊าซขึ้นให้เปิดตาราง แมคครา ดี แล้วรายงานเป็น จำนวนโคลิฟอร์มแบคทีเรียต่อตัวอย่าง 1 กรัม

3) การยืนยันโคลิฟอร์ม

ใช้ห่วง (loop) เขี่ยเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลบวก (positive) จากการทดสอบแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโคลิฟอร์ม ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue agar ในจานเพาะเชื้อ

บ่มจานเพาะเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง

ตรวจหาโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของโคลิฟอร์ม โดยโคโลนีของโคลิฟอร์มจะมีสีดำ หรือมีสีดำตรงกลางล้อมรอบด้วยบริเวณที่โปร่งใส ไม่มีสี โคลิฟอร์มบางโคโลนี มีลักษณะนูน เปียกเยิ้ม (mucoid)

4) การวิเคราะห์แบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli*

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) เขี่ยเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลบวก (positive) จากการทดสอบแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโคลิฟอร์ม ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Brillant green lactose bile broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อต้องปรับให้มีอุณหภูมิเท่ากับ 44.5 องศาเซลเซียสก่อนนำไปใช้

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

บ่มหลอดเลี้ยงเชื้อลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 44.5 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

หลอดทดลองที่มีก๊าซเกิดขึ้นหรือให้ผลบวก (positive) แสดงว่ามีแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็น *E. coli* ให้ทำการวิเคราะห์เพื่อยืนยัน *E. coli*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5) การวิเคราะห์เพื่อยืนยัน *E. coli*

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

บ่มจานเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง

เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *E.coli* ซึ่งมีสีน้ำเงินอมดำตรงกลาง มีสีเลื่อมมันอมเขียวสะท้อนแสง โดยบางครั้งสีเลื่อมมันอาจไม่ปรากฏ เขี่ยเชื้อครั้งละ 1 โคโลนีลงในน้ำทริปโตน (tryptone water) แล้วบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 44.5±0.5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เขี่ยเชื้อ *E.coli* มาตรฐานในหลอดน้ำทริปโตน เพื่อเป็นตัวอย่างควบคุม

ทดสอบสารอินโดล หลอดทดลองที่มีอินโดลเกิดขึ้น แสดงว่าเป็นเชื้อ *E. coli* จากนั้นบันทึกจำนวนหลอดทดลองที่ให้ผลบวก (positive)

คำนวณและรายงานค่า MPN ของ Coliform และ *E. coli* ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ 1 กรัม

การทดสอบยืนยันเพิ่มเติมเกี่ยวกับ Coliform และ *E. coli* ควรทำการทดสอบ Methyl red, Voges-Proskauer และ Citrate test โดยก่อนจะทดสอบปฏิกิริยาเหล่านี้ต้องแยกเชื้อ *E.coli* ให้บริสุทธิ์ก่อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์เยลลีเกรด (Jelly grade)

ตาราง ก 1 การทดสอบเยลลีเพื่อหาเกรดของเพกทินตามวิธีของ Commercial Pectin Preparation Food

เกรด	น้ำหนักเพกทิน (กรัม)	เกรด	น้ำหนักเพกทิน (กรัม)
10	50.00	120	4.17
20	25.00	130	3.85
30	16.66	140	3.57
40	15.50	150	3.33
50	10.00	160	3.12
60	8.33	170	2.94
70	7.14	180	2.78
80	6.25	190	2.63
90	5.55	200	2.50
100	5.00	210	2.38
110	4.55	220	2.27

ที่มา : Ranganna (1986)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ ข 1 แยมเสาวรสลดพลังงาน 16 สูตร ที่ใช้ในการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค

ภาพ ข 2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ ข 3 ห้องสำหรับผู้ทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค

ภาพ ข 4 ห้องเตรียมตัวอย่าง และเสิร์ฟตัวอย่างแก่ผู้ทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ ข 5 ผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบทางประสาทสัมผัสด้านความชอบโดยรวม การทา กลิ่นรส และรสหวาน

ภาพ ข 6 ของตอบแทนสำหรับผู้ทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส

ตาราง ก 2 ค่าเฉลี่ยคะแนนความชอบ* คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แยมเสาวรสลดพลังงาน 16 สูตรจากแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (n=100)

สูตร**	คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส			
	ความชอบโดยรวม	การทา	กลิ่นรส	รสหวาน
1	5.6 ± 1.4	4.6 ± 1.5	6.0 ± 1.3	5.8 ± 1.4
2	6.3 ± 1.5	5.4 ± 1.6	6.2 ± 1.3	5.7 ± 1.5
3	6.1 ± 1.4	5.7 ± 1.6	6.1 ± 1.3	5.7 ± 1.6
4	5.6 ± 1.5	4.0 ± 1.6	5.7 ± 1.4	5.9 ± 1.4
5	5.5 ± 1.4	4.0 ± 1.5	5.7 ± 1.3	5.8 ± 1.1
6	6.5 ± 1.2	6.5 ± 1.3	6.4 ± 1.3	6.1 ± 1.2
7	5.8 ± 1.3	5.1 ± 1.5	5.9 ± 1.4	5.7 ± 1.5
8	6.2 ± 1.3	6.0 ± 1.6	6.0 ± 1.3	5.8 ± 1.6
9	5.7 ± 1.4	4.4 ± 1.7	6.0 ± 1.3	5.9 ± 1.3
10	6.6 ± 1.2	7.3 ± 1.3	6.5 ± 1.4	5.8 ± 1.5
11	5.9 ± 1.3	5.0 ± 1.7	6.0 ± 1.2	6.3 ± 1.2
12	5.8 ± 1.3	4.9 ± 1.4	5.9 ± 1.2	6.1 ± 1.3
13	6.5 ± 1.4	6.8 ± 1.3	6.0 ± 1.5	6.2 ± 1.6
14	5.9 ± 1.3	4.5 ± 1.6	6.2 ± 1.3	5.9 ± 1.4
15	5.6 ± 1.4	4.8 ± 1.6	5.8 ± 1.4	5.9 ± 1.4
16	5.9 ± 1.3	4.9 ± 1.6	5.9 ± 1.2	5.9 ± 1.5

* ค่าเฉลี่ยของคะแนนความชอบของผู้บริโภค ทดสอบโดยใช้ 9-point hedonic scale โดย คะแนน 1 คือ ไม่ชอบมากที่สุด คะแนน 5 คือ ตอบไม่ได้ว่าชอบหรือไม่ชอบ และคะแนน 9 คือ ชอบมากที่สุด

** หมายเลขของสูตรในการทดลอง อ้างอิงตามสูตร แสดงในตาราง 3.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาววิศนี วรรณนิยม

วัน เดือน ปี เกิด 30 มกราคม 2527

ประวัติการศึกษา ระดับมัธยมศึกษา
โรงเรียนสอาดเผดิมวิทยา จังหวัดชุมพร ปีการศึกษา 2544

ระดับปริญญาตรี
วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
คณะเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยรังสิต ปีการศึกษา 2548

ประวัติผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่

วิศนี วรรณนิยม และสุจินดา ศรีวัฒนะ. 2552. ศักยภาพของเปลือกในเสาวรสที่ใช้แทนเพกทินเมธ็อกซิลต่ำทางการค้าในแยมเสาวรสลดพลังงาน. การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติครั้งที่ 13. วันที่ 15-16 พฤษภาคม 2552, มหาวิทยาลัยนอร์ทเชียงใหม่. เชียงใหม่.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved