บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

มะม่วงแก้วที่ใช้ในการทดลอง เป็นผลมะม่วงสดที่ให้ผลผลิตในช่วงเดือนมีนาคมถึงมิถุนายนของปี พ.ศ. 2548-2549 โดยซื้อมาจากตลาดขายส่งเมืองใหม่ ต. ช้างม่อย อ. เมือง จ. เชียงใหม่ นำผลมะม่วงมาคัดเลือกผลอ่อน-ผลแก่ โดยใช้ค่าความถ่วงจำเพาะให้ผลมะม่วงจม-ลอยในน้ำ แล้วคัดเลือกเอาเฉพาะผลมะม่วงที่จมในน้ำแล้วผึ่งผิวให้แห้ง (ประเสริฐ, 2544)

3.2 การบ่มมะม่วง

นำผลมะม่วงแก้วที่คัดเลือกแล้วมาจัดเรียงซ้อนกัน 3-4 ชั้น ในกล่องกระดาษขนาดกว้างxยาวxสูง เท่ากับ 39x65x35 เซนติเมตร ที่รองด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ โดยบรรจุผลมะม่วงกล่องละ 10 กิโลกรัม จากนั้นชั่งแคลเซียมคาร์ไบด์ในอัตราส่วน 10 กรัมต่อมะม่วง 1 กิโลกรัม โดยห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์แล้วนำไปวางตามจุดต่างๆ ให้ทั่วกล่อง วาง data logger (Testo 175, Germany) ไว้บริเวณตรงกลางกล่อง (ภาพภาคผนวก ฉ-1) เพื่อบันทึกอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศระหว่างการบ่มผลมะม่วง คลุมด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์อีกชั้นหนึ่ง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 33±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ 45-60 เปอร์เซ็นต์

ทำการสุ่มผลมะม่วงออกมาวัดสีเนื้อ ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (Total Soluble Solids; TSS) และปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (Tritrable Acidity; TA) ทุกๆ วัน วันละ 3 ผล จนผลมะม่วงมีอัตราส่วนของปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ต่อปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (TSS:TA) อยู่ในช่วง 12-13

3.3 การเตรียมวัตถุดิบและสารละลายในการทดลอง

3.3.1 การเตรียมชิ้นมะม่วง

เมื่อผลมะม่วงที่บ่มแล้วมีอัตราส่วนของปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ต่อปริมาณกรดที่ไทเทรตได้อยู่ในช่วง 12-13 นำผลมะม่วงมาล้างผิวนอกให้สะอาด เช็ดให้แห้ง ปอกเปลือก และหั่นเนื้อมะม่วงให้เป็นทรงลูกบาศก์ขนาด 0.5x0.5x0.5 เซนติเมตร ดังภาพ 3.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3.1 ลักษณะชิ้นเนื้อมะม่วงทรงลูกบาศก์ขนาด 0.5x0.5x0.5 เซนติเมตร

3.3.2 การเตรียมสารละลายในการแช่ชิ้นเนื้อมะม่วง

สูตรของสารละลายที่ใช้ต่อน้ำ 100 กรัม ประกอบด้วย

- น้ำตาลซูโครส (มิตรผล, เชียงใหม่)	55	กรัม
- กลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$: technical grade)	45	กรัม
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl: food grade)	2	กรัม
- แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$: food grade)	0.15	กรัม
- โพแทสเซียมซอร์เบต ($C_6H_7KO_2$: food grade)	0.25	กรัม
- โพแทสเซียมเมตตาไบซัลไฟต์ ($K_2S_2O_5$: food grade)	0.25	กรัม

1. ชั่งสารแต่ละชนิด และละลายสารทั้ง 6 ชนิดด้วยน้ำในบีกเกอร์ขนาด 2,000 มิลลิลิตร

2. ใช้อัตราส่วนสารละลาย : ชิ้นเนื้อมะม่วง เท่ากับ 1:1 โดยน้ำหนัก เช่น เมื่อต้องการแช่เนื้อมะม่วง 1 กิโลกรัม จะต้องใช้สารละลาย 1 กิโลกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 การศึกษาผลของอุณหภูมิของสารละลาย ระยะเวลาในการแช่ชิ้นเนื้อมะม่วงในสารละลายออสโมติก และอุณหภูมิในการอบแห้งชิ้นเนื้อมะม่วง

นำบีกเกอร์ที่บรรจุสารละลายแช่ลงใน heating circulator water bath รอจนกระทั่งสารละลายมีอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่กำหนดประมาณ 10 องศาเซลเซียส แล้วนำชิ้นเนื้อมะม่วงที่เตรียมไว้มาแช่ในสารละลาย (Jena and Das, 2005) ปรับอุณหภูมิของสารละลายให้คงที่ที่ 40 องศาเซลเซียส แช่ชิ้นเนื้อมะม่วงเป็นเวลา 3 และ 4 ชั่วโมง และสารละลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แช่ชิ้นเนื้อมะม่วงเป็นเวลา 3 และ 4 ชั่วโมง มีการกวนเป็นครั้งคราวอย่างสม่ำเสมอ สุ่มตัวอย่างออกมาทุกๆ 15 นาทีใน 1 ชั่วโมงแรก ทุกๆ 30 นาทีในชั่วโมงที่ 2 และหลังจากนั้นทุกๆ 1 ชั่วโมงจนครบเวลาที่กำหนด นำตัวอย่างที่สุ่มได้มาล้างโดยการจุ่มในน้ำกลั่น 4-5 วินาที แล้วซับด้วยกระดาษทิชชู นำไปหาปริมาณความชื้นเพื่อคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของน้ำ (ภาคผนวก ก)

เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด ทำการกำจัดน้ำตาลส่วนเกินโดยการล้างผ่านน้ำเย็นที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยให้สะเด็ดน้ำ ซับด้วยกระดาษทิชชู ชั่งน้ำหนักชิ้นเนื้อมะม่วงหลังผ่านกระบวนการออสโมติกดีไฮเดรชันเพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำ (water loss percentage) และเปอร์เซ็นต์ของแข็งที่เพิ่มขึ้น (solids gain percentage) จากนั้นนำมาผึ่งที่อุณหภูมิห้อง (33±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ผ้าขาวบางคลุมเพื่อป้องกันฝุ่นและแมลง

ภายหลังจากผึ่งชิ้นเนื้อมะม่วงที่ผ่านวิธีออสโมติกดีไฮเดรชันแล้ว นำมาอบแห้งด้วยเทคนิคฟลูอิดไดเซชัน โดยใช้เครื่องอบแห้งแบบสเปาเต็ดเบด (spouted bed: Sherwood Scientific Ltd., England) ที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส ความเร็วลมเท่ากับ 3.65 เมตรต่อวินาที (ความเร็วสูงสุดของเครื่อง) ซึ่งการอบแห้งในแต่ละครั้งใช้ชิ้นเนื้อมะม่วงจำนวน 300 กรัมต่อครั้ง (ภาพภาคผนวก จ-3) จนกระทั่งเนื้อมะม่วงอบแห้งมีระดับความชื้นประมาณ 12-13 เปอร์เซ็นต์ฐานเปียก และค่า a_w ต่ำกว่า 0.50

ทำการทดลองโดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD ทำการทดลอง 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งทำการตรวจวัดข้อมูล 2 ซ้ำ

3.5 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

นำชิ้นมะม่วงอบแห้งที่ได้ในแต่ละกรรมวิธีมาประเมินผลทางประสาทสัมผัสโดยใช้ผู้ทดสอบชิม (consumer test) จำนวน 50 คน ในหัวข้อลักษณะปรากฏภายนอกโดยรวม (overall appearance) ได้แก่ รูปร่างและสี และหัวข้อรสชาติโดยรวม (overall flavor) ซึ่งทั้งนี้ใช้แบบทดสอบแบบ 9-points hedonic scale (ภาคผนวก ง) เพื่อคัดเลือกกรรมวิธีที่ดีที่สุดและได้รับการยอมรับดีที่สุดสำหรับใช้ทดลองการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6 การศึกษาสภาพการบรรจุภัณฑ์และอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของชิ้นเนื้อมะม่วงแก้วอบแห้ง

ผลการประเมินทางประสาทสัมผัส และคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี จะทำให้ทราบว่าเนื้อมะม่วงแก้วอบแห้งที่ผ่านการผลิตสภาวะใดเหมาะสมที่สุดและได้คะแนนการยอมรับดีที่สุด นำตัวอย่างชิ้นเนื้อมะม่วงแก้วอบแห้งที่ได้คะแนนการยอมรับดีที่สุดมาศึกษาผลของสภาพภายในบรรจุภัณฑ์และอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาต่อคุณภาพของเนื้อมะม่วงแก้วอบแห้ง โดยศึกษาสภาพภายในบรรจุภัณฑ์ 2 สภาพ คือ

ก. บรรจุในถุงอลูมิเนียมเปลวในสภาพบรรยากาศปกติ

ข. บรรจุในถุงอลูมิเนียมเปลวที่อัดแก๊สไนโตรเจนที่ -0.9 บาร์ (vaccum sealer with gas modifier: NV-002HG, Neo Pak)

สำหรับอุณหภูมิที่ศึกษา ได้แก่ การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง (33±2 องศาเซลเซียส) การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD ทำการทดลอง 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งทำการตรวจวัดข้อมูล 2 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย ทำการวิเคราะห์คุณภาพในแต่ละกรรมวิธีที่ระยะเวลาต่างๆ ได้แก่ ในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษานาน 0, 2, 4, 8, 16 และ 24 สัปดาห์

คุณภาพของเนื้อมะม่วงอบแห้งที่ศึกษา ได้แก่ การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และทางจุลชีววิทยา

3.7 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ

3.7.1 การวัดค่าสีเนื้อของผลมะม่วงแก้ว

วัดค่าสีโดยใช้เครื่องวัดสี (Color Quest XE, USA) วัดสีเนื้อของผลมะม่วงแก้วจำนวน 3 ผลต่อซ้ำ โดยเฉือนเปลือกบริเวณกลางผลมะม่วงออกให้ลึกประมาณ 1 เซนติเมตร ทั้ง 2 ด้าน และหาค่าเฉลี่ย ค่าที่ได้รายงานผลเป็นค่า L*, hue angle (h^o) และ Chroma (C*)

3.7.2 การวัดค่าสีของเนื้อมะม่วงอบแห้ง

วัดค่าสีโดยใช้เครื่องวัดสี วัดสีเนื้อมะม่วงอบแห้ง โดยใส่ชิ้นเนื้อมะม่วงอบแห้งใน quart cell จนเต็ม วัดสีทั้งด้านหน้าและด้านหลังเพื่อหาค่าเฉลี่ย ค่าที่ได้รายงานผลเป็นค่า L*, h^o และ C*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่า L*	เป็นค่าที่แสดงสีขาว-ดำ	หากมีค่าเข้าใกล้ 0 สีของวัตถุจะมีสีคล้ำ
		หากมีค่าเข้าใกล้ 100 สีของวัตถุจะมีสีขาว
ค่า h^o	เป็นค่าที่แสดงช่วงสีของวัตถุ	
	หากมีค่าเข้าใกล้ 90 องศา	สีของวัตถุจะอยู่ใกล้สีเหลือง (+b)
	หากมีค่าเข้าใกล้ 180 องศา	สีของวัตถุจะอยู่ในกลุ่มสีเขียว (-a)
ค่า C*	หากมีค่าเข้าใกล้ 0	สีของวัตถุจะมีสีซีดจาง (เทา)
	หากมีค่าเข้าใกล้ 60	สีของวัตถุจะมีสีเข้ม

3.7.3 การวัดลักษณะเนื้อสัมผัส

วัดค่าแรงกดทับของชิ้นเนื้อมะม่วงอบแห้ง (compression force) ด้วยเครื่อง Texture analyzer (Stable Micro System: Model TA-Xti/50, England) ใช้หัวกดแบบ P6 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร โดยให้กดลงไป 80 เปอร์เซ็นต์ ของความสูงชิ้นมะม่วงอบแห้ง และใช้อัตราเร็วในการเคลื่อนที่สูงสุด 10 มิลลิเมตรต่อวินาที (ภาพภาคผนวก ฉ-4) อ่านค่าเป็นหน่วยนิวตัน ทำการวัดค่าแรงกดทับกรรมวิธีละ 2 ซ้ำ โดยแต่ละซ้ำใช้ตัวอย่าง 10 ชิ้น แล้วหาค่าเฉลี่ย

3.7.4 การวัดค่า a_w

วัดค่า a_w ด้วยเครื่องวัดวอเตอร์แอคทิวิตี้ (Novasina: aw center: large set, Switzerland) โดยบรรจุเนื้อมะม่วงอบแห้งลงในตลับสำหรับใส่ตัวอย่างประมาณครึ่งหนึ่งของตลับ (ภาพภาคผนวก ฉ-5) ทำการวิเคราะห์ 2 ครั้งต่อหนึ่งตัวอย่าง แล้วหาค่าเฉลี่ย

3.8 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี

3.8.1 ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000: method 934.06)

ชั่งตัวอย่างชิ้นเนื้อมะม่วงสดหรือเนื้อมะม่วงอบแห้งประมาณ 5 กรัม ใส่ใน moisture can ที่ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปอบใน Vacuum Dryer (Binder: Model VD 53, Germany) ที่อุณหภูมิ 70±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วันหรือจนกระทั่งมีน้ำหนักคงที่ ภายใต้ความดันน้อยกว่าหรือเท่ากับ 100 mmHg (13.3 kPa) นำออกจากตู้อบแล้วปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo: PB 1502-5, Switzerland) ทำการวิเคราะห์ 2 ครั้งต่อหนึ่งตัวอย่าง เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น จากสมการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{ความชื้น (\%ฐานเปียก)} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ})}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

3.8.2 ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ของเนื้อมะม่วงแก้ว (AOAC, 2000: method 934.15)

คั้นน้ำมะม่วงแก้วมาไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล (Ajax Finechem, Australia) โดยใช้เครื่องออโตไทเทรต (Automatic Tritator 'Schott': Tritroline easy M2-230V, Germany) กำหนดจุดยุติที่ pH เท่ากับ 8.1 ก่อนใช้เครื่องต้องทำการ Calibration ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่าง ที่ 7 และ 10 ทุกครั้ง โดยใช้ผลมะม่วงแก้ว 3 ผลต่อซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

3.8.3 ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ของเนื้อมะม่วงอบแห้ง (AOAC, 2000: method 934.15)

ชั่งน้ำหนักเนื้อมะม่วงอบแห้ง 10 กรัม ปั่นผสมกับน้ำกลั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร นำตัวอย่างที่เตรียมได้มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No. 1) จากนั้นปิเปตสารละลายใส 30 มิลลิลิตร มาไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล โดยใช้เครื่องออโตไทเทรต กำหนดจุดยุติที่ pH เท่ากับ 8.1 ก่อนใช้เครื่องต้องทำการ Calibration ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่าง ที่ 7 และ 10 ทุกครั้ง ทำการวิเคราะห์ 2 ครั้งต่อหนึ่งตัวอย่าง แล้วหาค่าเฉลี่ย

คำนวณโดยใช้สูตร

$$\%TA = \frac{\text{ความเข้มข้นของ NaOH (N)} \times \text{ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ (ml)} \times 0.064^* \times 100}{\text{ปริมาตรน้ำคั้นของมะม่วง (ml)}}$$

* milliequivalent of citric acid (anhydrous) = 0.064

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.8.4 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ของเนื้อมะม่วงแก้ว (AOAC, 2000: method 932.12)

นำน้ำคั้นที่ได้จากข้อ 3.8.2 มาวัดหาปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ ด้วยเครื่อง Digital Refractometer (ATAGO: PAL-1, Japan) บันทึกค่าในหน่วยเปอร์เซ็นต์ ก่อนใช้ควร

ปรับเครื่องให้อ่านค่าเป็นศูนย์ด้วยน้ำกลั่นทุกครั้ง ทำการวิเคราะห์ 2 ครั้งต่อหนึ่งตัวอย่าง แล้วหาค่าเฉลี่ย

3.8.5 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ของเนื้อมะม่วงอบแห้ง

นำน้ำปั่นที่กรองแล้วจากการข้อ 3.8.3 มาวัดหาปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ของเนื้อมะม่วงอบแห้ง ด้วยเครื่อง Digital Refractometer บันทึกค่าในหน่วยเปอร์เซ็นต์ที่ได้คูณกลับตามอัตราส่วนที่เจือจาง 10 เท่า (ประสิทธิ์, 2548) ก่อนใช้ควรปรับเครื่องให้อ่านค่าเป็นศูนย์ด้วยน้ำกลั่นทุกครั้ง ทำการวิเคราะห์ 2 ครั้งต่อหนึ่งตัวอย่าง แล้วหาค่าเฉลี่ย

3.8.6 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา

การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) (AOAC, 2000: method 966.23)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA; Merck, Germany) 23.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มจนเดือด

ข. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในหม้อนึ่งความดัน

วิธีการวิเคราะห์

- <u>การเตรียมตัวอย่าง</u>

1. ใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อ โด ยการลนไฟและเช็ดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ คีบตัวอย่างชิ้นเนื้อมะม่วงอบแห้งมาประมาณ 10 กรัม ใส่ในถุงตีบด (stomacher bag) ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เพปโตน 90 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องตีบด (stomacher) เพื่อให้สารละลายตัวอย่างผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จะได้อาหารที่เจือจาง 1:10 หรือ 10^{-1}

2. เขย่าตัวอย่างให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างสารละลายเนื้อมะม่วงอบแห้งที่เจือจาง 1:10 หรือ 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เพปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้อาหารที่เจือจาง 1:100 หรือ 10^{-2}

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. นำอาหารเจือจาง 1:100 หรือ 10^{-2} มาเจือจางอีกครั้งตามข้อ 2 เพื่อให้ได้อาหารเจือจางที่ 1:1000 หรือ 10^{-3}

- การใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรที่ฆ่าเชื้อแล้ว ดูดสารละลายอาหารตัวอย่างที่ระดับเจือจางต่างๆ (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}) ลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร ระดับเจือจางละ 2 จาน โดยเริ่มดูดจากที่ความเข้มข้นต่ำสุด

2. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่กำลังหลอมเหลวลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่าง โดยใส่ลงในจานๆ ละประมาณ 15-20 มิลลิลิตร ให้เสร็จภายในเวลา 1-2 นาที

3. ผสมสารละลายตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันดี วางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว คว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อลง

- การบ่ม

บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 34 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 3 ชั่วโมง

- การตรวจนับจำนวนโคโลนีและการรายงานผล

หลังจากบ่มเชื้อตามกำหนดเวลาแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยจากจำนวนโคโลนีทั้ง 2 จานเพาะเชื้อ รายงานผลการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในรูปโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม

การวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และรา (Yeast and Mold) (AOAC, 2000: method 997.02)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA; Ajak Finechem, India) 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มจนเดือด

ข. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในหม้อนึ่งความดัน

ค. ปรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3.5 โดยการเติมสารละลายกรดทาร์ทาริก ความเข้มข้นร้อยละ 10 ลงไป (อาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร ใช้สารละลายกรดทาร์ทาริก 1.9 มิลลิลิตร)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการวิเคราะห์

- <u>การเตรียมตัวอย่าง</u>

1. ใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อ โดยการลนไฟและเช็ดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ คีบตัวอย่างชิ้นเนื้อมะม่วงอบแห้งมาประมาณ 10 กรัม ใส่ในถุงตีบดที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เพปโตน 90 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องตีบดเพื่อให้สารละลายตัวอย่างผสมเป็นเนื้อเดียวกันจะได้อาหารที่เจือจาง 1:10 หรือ 10^{-1}

2. เขย่าตัวอย่างให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างสารละลายเนื้อมะม่วงอบแห้งที่เจือจาง 1:10 หรือ 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เพปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้อาหารที่เจือจาง 1:100 หรือ 10^{-2}

3. นำอาหารเจือจาง 1:100 หรือ 10^{-2} มาเจือจางอีกครั้งตามข้อ 2 เพื่อให้ได้อาหารเจือจางที่ 1:1000 หรือ 10^{-3}

- <u>การใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

1. ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรที่ฆ่าเชื้อแล้ว ดูดสารละลายอาหารตัวอย่างที่ระดับเจือจางต่างๆ (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}) ลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร ระดับเจือจางละ 2 จาน โดยเริ่มดูดจากที่ความเข้มข้นต่ำสุด

2. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่กำลังหลอมเหลวลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่าง โดยใส่ลงในจานๆ ละประมาณ 15-20 มิลลิลิตร ให้เสร็จภายในเวลา 1-2 นาที

3. ผสมสารละลายตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันดี วางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว คว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อลง

- <u>การบ่ม</u>

บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ± 3 ชั่วโมง

- <u>การตรวจนับจำนวนโคโลนีและการรายงานผล</u>

หลังจากบ่มเชื้อตามกำหนดเวลาแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยจากจำนวนโคโลนีทั้ง 2 จานเพาะเชื้อ รายงานผลการตรวจนับจำนวนยีสต์และรา ในรูปโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.9 การคำนวณผลทางสถิติ

นำค่าที่ได้มาคำนวณทางสถิติโดยหาค่าเฉลี่ย ค่าความผันแปร เปรียบเทียบค่าโดยใช้ LSD และหาสมการความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (Analytical Software Statistix version 8)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved