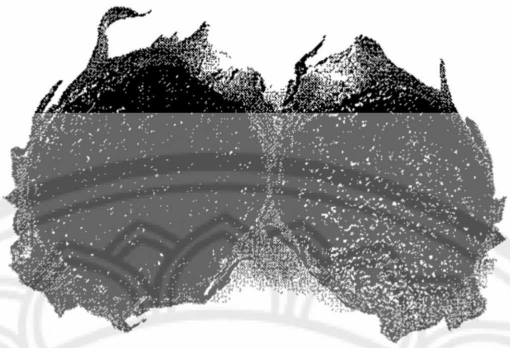
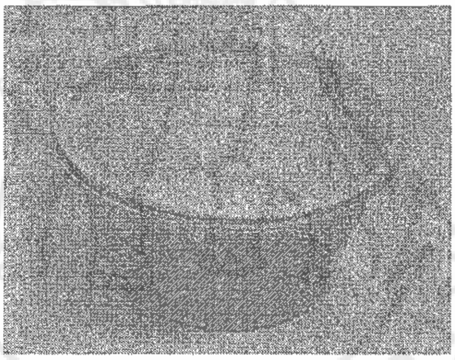
# ภาคผนวก

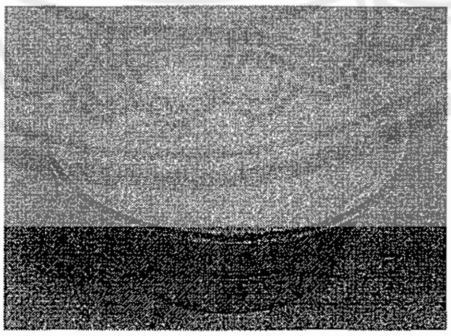
**ภาคผนวก ก ภาพวัตถุดิบ**



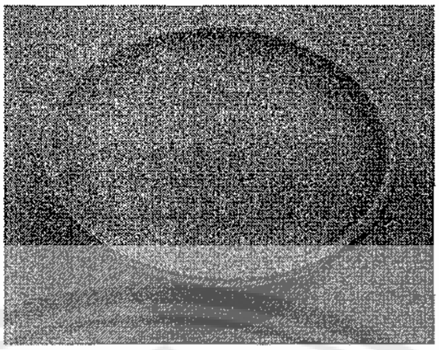
ภาพ 9 ผลแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดง (Hylocereus costaricensis)



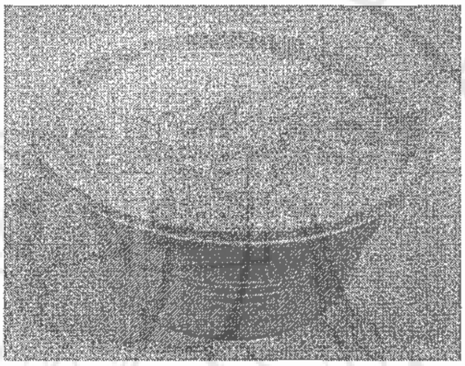
ภาพ 10 นมขาดมันเนย พาสเจอร์ไรส์ (Skim-milk pasteurized, CP MEIJI)



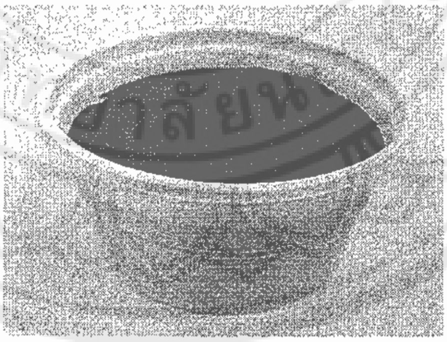
ภาพ 11 น้ำตาลทราย (sugar, MITR PHOL)



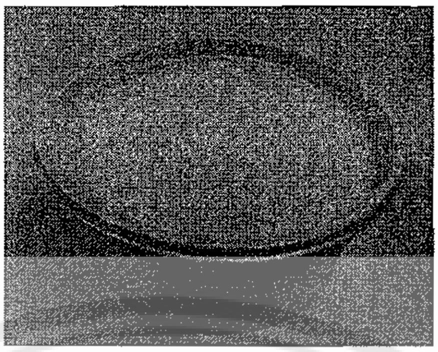
ภาพ 12 ครีมจากน้ำนมวัว (Whipping cream pasteurized, Nestle)



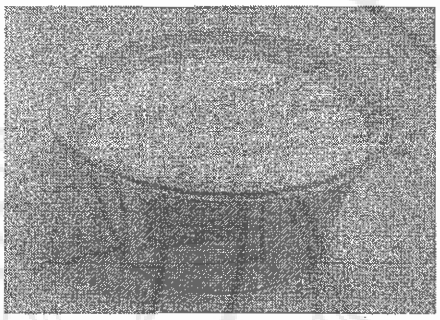
ภาพ 13 หางนมผง (Skim-milk, MMD 8000)



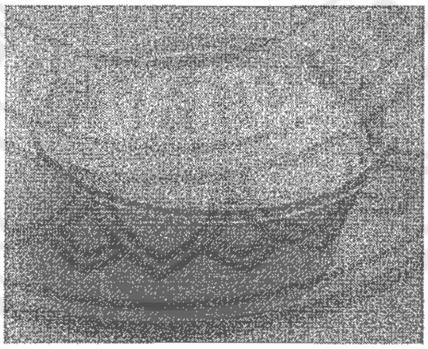
ภาพ 14 กลิ่นวานิลลา (Vanilla, PHULIN & PHURICH)



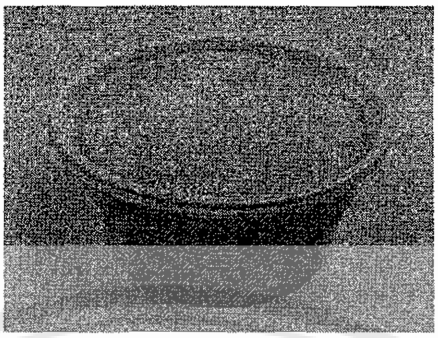
ภาพ 15 สารทดแทนไขมัน N-LITE D (National Starch & Chemical (Thailand) Ltd.)



ภาพ 16 สารทดแทนไขมัน ALPHA TAPIOCA STARCH
(Thai Wah Alpha Starch Co.,Ltd.)



ภาพ 17 สารทดแทนไขมัน BENEO-GR (DPO (Thailand) Ltd.)



ภาพ 18 **สารช่วยความคงตัว/อิมัลซิไฟเออร์** Palsgaard® 5988 (DPO (Thailand) Ltd.)

## ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางด้านเคมี กายภาพและจุลินทรีย์

### 1. การวิเคราะห์ทางด้านเคมี

1.1 การวิเคราะห์ความชื้น

**วิธีทำแห้งโดยใช้ตู้อบลมร้อน** (Hot air oven methods)

1.1.1 ชั่งน้ำหนักถ้วยอลูมิเนียมพร้อมฝาที่ผ่านการอบแห้งจนมีน้ำหนักคงที่แล้ว บันทึกน้ำหนัก

1.1.2 ตักตัวอย่างลงในถ้วยอลูมิเนียมประมาณ 2 กรัม เกลี่ยให้ตัวอย่างแผ่ด้วยความหนาสม่ำเสมอ ปิดฝา บันทึกน้ำหนัก

1.1.3 วางตัวอย่างในตู้อบลมร้อนโดยปิดฝาอลูมิเนียมบางส่วน อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

1.1.4 เมื่อครบเวลา ปิดฝาถ้วย แล้วนำตัวอย่างใส่ในโถที่มีสารดูดความชื้น ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง (ใช้เวลาประมาณ 45 นาที)

1.1.5 นำตัวอย่างออกมาชั่ง บันทึกน้ำหนัก

1.1.6 นำตัวอย่างเข้าอบอีกประมาณ 30 นาที หลังจากตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก ถ้าน้ำหนักเปลี่ยนแปลงไปจากครั้งแรกน้อยกว่า 0.003 กรัม ให้ยุติการอบ บันทึกน้ำหนักสุดท้าย

1.1.7 คำนวณหาปริมาณความชื้นจากน้ำหนักที่หายไป

$$\text{ความชื้น (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มแรก-น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

1.2 การวิเคราะห์โปรตีน โดยวิธี Micro Kjeldahl (A.O.A.C, 1995)

วิธีการหาไนโตรเจน (N) ด้วย kjeldahl method มี 3 ขั้นตอนดังนี้

1. **การย่อย** (digestion) เป็นการทำลายพันธะเคมีของตัวอย่างให้กลายเป็นโมเลกุลเล็กๆสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบจะถูกเปลี่ยนไปเป็นอัมโมเนียมซัลเฟต ในปฏิกิริยาการย่อยเพื่อให้ reaction mixture มีอุณหภูมิจุดเดือด การ hydrolysis ของกรดซัลฟูริคเข้มข้นที่ใช้อยู่ระหว่าง 370-400 องศาเซลเซียส จึงต้องเติม catalyst ลงไป

2. **การกลั่น** (distillation) เมื่อเติม NaOH ลงไปในสารละลายที่ผ่านกระบวนการย่อยและมี $(NH_4)_2SO_4$ อยู่แล้วกลั่น เอาก๊าซอัมโมเนียออกมาโดยการกลั่น ก๊าซที่ได้จะถูกจับไว้ด้วยสารละลายกรดบอริค

3. **การไตเตรดและการคำนวณ** (Titrate and Calculation) ทำการไตเตรดสารละลายกรดบอริคในขั้นตอนการกลั่นด้วย กรด HCl 0.1 N หาปริมาณไนโตรเจนที่กลั่นได้โดยใช้อินดิเคเตอร์ที่เปลี่ยนสีในช่วง pH 5-6 เมื่อถึงจุด end point สีจะเปลี่ยนเป็นสีเทา การคำนวณหาโปรตีน คำนวณได้จากปริมาณไนโตรเจนที่ได้ คูณด้วย conversion factor คำนวณหาโดยเปรียบเทียบกับปริมาณไนโตรเจนของโปรตีนทั้งหมด 100 ส่วนที่มีในอาหารชนิดต่าง ๆ

**อุปกรณ์และเครื่องแก้ว**

1. Kjeldahl apparatus : digestion unit, distillation unit
2. เครื่องชั่งอ่านได้ละเอียด 4 ตำแหน่ง และอุปกรณ์เครื่องแก้วในการชั่งเตรียมสาร
3. อุปกรณ์ไตเตรต;บิวเรต ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บิกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร
4. Boiling stone

**สารเคมีที่ใช้**

| | |
|---|---|
| 1. คะตะลิสต์ผสม (Catalyst mixture) | |
| $Na_2SO_4$ (anhydrous) | ร้อยละ 95 |
| $CuSO_4$ | ร้อยละ 3.5 |
| SeO (เซเลเนียมไฮดรอกไซด์) | ร้อยละ 0.5 |
| 2. กรดกำมะถันเข้มข้น | |
| 3. สารละลายกรดบอริค | ร้อยละ 2 |
| 4. Mixed indicator | |
| 5. สารละลาย NaOH | ร้อยละ 50 |
| 6. สารละลายกรดกำมะถันเข้มข้น | 0.05 M (molarity) |

**วิธีการทดลอง**

1. **การชั่งเตรียมตัวอย่าง**

1.1 ตัวอย่างต้องละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันไม่แยกชั้นและต้องระวังอย่าให้มีฟองอากาศ น้ำหนักหรือปริมาณตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์โดยทั่วไป

ของแข็ง : %N>5 ใช้ตัวอย่าง 0.5 กรัม กรณี%N<5 ใช้ตัวอย่าง 1.0 กรัม

ของเหลว : 10-100 มิลลิลิตร

* กรณีเป็นอาหารสด ปริมาณอาหารตัวอย่างต้องเพิ่มขึ้น*

ไอศกรีม 3.3 กรัม

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างอาหารด้วยเครื่องชั่งละเอียด (กรณีเป็นของเหลวใช้ปิเปต) ใส่ในหลอดสำหรับย่อย

2. เติมสารเคมีสำหรับย่อย : ได้แก่ boiling stone 2 ชิ้น (เฉพาะอาหารเหลวที่ปริมาณ >10 มิลลิลิตร) Mixed catalyst 10 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น (ร้อยละ 98) 20 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดสำหรับย่อย และทำ blank (ไม่ต้องใส่ตัวอย่างอาหาร)

3. การย่อยตัวอย่างอาหาร : preheat เครื่องย่อยประมาณ 10 นาที (ปรับสวิทซ์ที่หมายเลข 10) แล้วบรรจุหลอดสำหรับย่อยใส่ในเครื่องย่อยตัวอย่างอาหารและทำการย่อยจนได้สารละลายใส(ใช้เวลาประมาณ 30-45 นาที ที่สวิทซ์หมายเลข 10 ประมาณไม่เกิน 2 ชั่วโมง ที่สวิทซ์หมายเลข 8)

4. การทำตัวอย่างให้เย็น : นำหลอดสำหรับย่อยออกจากเครื่องย่อย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 20 นาที

5. การกลั่นตัวอย่างอาหาร:

5.1 นำหลอดสำหรับย่อยบรรจุในเครื่องกลั่น เครื่องกลั่นจะเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ร้อยละ 32) 70 มิลลิลิตร

5.2 เตรียม Receiver โดยเติมสารละลายกรดบอริค (ร้อยละ 2) 60 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และหยด Mixed indicator 2 หยด บรรจุใส่เครื่องกลั่นและจุ่มปลายท่อนำก๊าซแอมโมเนียให้อยู่ในระดับต่ำกว่าสารละลายใน Receiver

5.3 กลั่น นานประมาณ 3-4 นาที แล้วใช้น้ำกลั่นล้างท่อนำก๊าซและปลายท่อนำก๊าซใส่ลงในขวดรูปชมพู่

6. ไตเตรต : ไตเตรตในสารละลาย Receiver ด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐานเข้มข้น 0.1 N จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้มแดง

7. การคำนวณ : $\% N = (V_1-V_2)*N*f*1400/Emg$

: $g N/l = (V_1-V_2)*N*f*14/Eml$

: $\% protein = \% N*F$

โดย $V_1$ = ปริมาณสารละลายกรดมาตรฐานที่ใช้ในการไตเตรตอาหารตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

$V_2$ = ปริมาณสารละลายกรดมาตรฐานที่ใช้ในไตเตรต blank (มิลลิลิตร)

N = Normality of acid

f = factor of acid = 1

E = จำนวนตัวอย่าง (กรัม หรือ มิลลิลิตร)

F = conversion factor

**หมายเหตุ** :

1. กรณีตัวอย่างเป็นของเหลวอาจต้องใช้กำมะถันในการย่อยเพิ่มขึ้น

2. การใช้โปตัสเซียมหรือโซเดียมซัลเฟตในปริมาณมากเกินไป จะทำให้แอมโมเนียสลายตัว

3. conversion factor = ปริมาณโปรตีน/ปริมาณของ N ที่องค์ประกอบในโปรตีนนั้นๆ โดยทั่วไป N = 16 ดังนั้น conversion factor = 100/16 =6.25

4. สารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐาน 0.05 M (0.1N) มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาสมมูลย์พอดีกับ N 0.0014 กรัม

1.2 การวิเคราะห์ไขมัน (Fat)

**อุปกรณ์**

ขวดก้นแบน 250 มิลลิลิตร

soxhlet extraction

condenser

thimble

**สารเคมี**

ปิโตรเลียม อีเทอร์ (Petroleum ether)

**วิธีการ**

1. อบขวดก้นแบนในตู้อบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นใน desicator ชั่งน้ำหนัก

2. ชั่งตัวอย่างแห้งลงบนกระดาษกรอง นำตัวอย่างใส่ลงใน thimble อุดสำลีบน thimble เพื่อป้องกันมิให้ตัวทำละลายหยดถูกตัวอย่างโดยตรง

3. ใส่ thimble ลงใน Extraction tube และต่อเข้ากับ condenser

4. เติม petroleum ether ลงในขวดก้นแบนประมาณ 200 ml

5. ปิดเตาให้ความร้อน ใช้เวลาในการสกัดไขมันประมาณ 16 ชั่วโมง

6. เมื่อครบเวลา ระเหย petroleum ether ในขวดก้นแบน แล้วนำขวดไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นใน desiccator

7. ชั่งน้ำหนักขวดและคำนวณน้ำหนักของไขมันที่ได้คิดเป็นเปอร์เซ็นต์

1.3 การวิเคราะห์ใยอาหาร

**วัสดุและอุปกรณ์**

1. เครื่องวิเคราะห์เยื่อใย ยี่ห้อ FIBERTEC System M
2. ภาชนะใส่กรดและด่างที่สามารถต้มได้
3. ชุดให้ความร้อน

**สารเคมี**

1. กรดซัลฟูริก (sulfuric acid) 0.128
2. โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide) เข้มข้น 0.223 M
3. เอ็น-ออกทานอล (n-octanol)
4. อะซิโตน (acetone)

**วิธีการ**

1. เปิดก๊อกน้ำเย็นสำหรับระบบ reflux ให้มีอัตราไหลของน้ำประมาณ 1-2 ลิตรต่อนาที

2. เปิดสวิทซ์เครื่อง

3. ชั่งน้ำหนักแน่นอนของตัวอย่างที่บดละเอียด จำนวน 1 กรัม ใส่ลงใน crusible ถ้าตัวอย่างมีปริมาณไขมันสูงกว่า ร้อยละ 5 ให้ทำการสกัดไขมันออกจากตัวอย่างก่อนนำมาวิเคราะห์

4. วาง crucible ลงในช่องสำหรับวาง crucible ในเครื่องที่ส่วนสกัดด้วยความร้อน (Hot Extraction Unit) โยกคันล็อคให้เข้าที่

5. เติมกรดซัลฟูริกร้อน (อุณหภูมิประมาณ 95-100 องศาเซลเซียส) เข้มข้น 0.128 M จำนวน 150 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ทางด้านบน

6. เติมเอ็น-ออกทานอลจำนวน 2-3 หยด เพื่อป้องกันการเกิดฟอง

7. ปิดฝาเครื่องให้เรียบร้อย แล้วเริ่มให้ความร้อนจนเดือด แล้วลดความร้อนลงต้มเดือดอ่อน ๆ เป็นเวลาประมาณ 30 นาที

8. กรองโดยเลื่อนคันโยกมาที่ตำแหน่ง vacuum ถ้าไม่ลงให้ใช้ pressure ช่วย

9. ล้างด้วยความร้อน 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 30 มิลลิลิตร กรองจนแห้ง

10. เติมโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.223 M ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ทำเช่นเดียวกับกรดซัลฟูริก (ข้อ 6-9)

11. นำ crucible ออกจากเครื่องที่ส่วนสกัดด้วยความร้อน (Hot Extraction Unit) โดยใช้ crucible

12. ล้างด้วยอะซิโตนอย่างน้อย 3 ครั้ง ครั้งละ 25 มิลลิลิตร

13. นำ crucible ไปอบให้แห้งในตู้อบความร้อน ที่อุณหภูมิ 100-102 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18 วัน หรืออบที่อุณหภูมิประมาณ 130 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก บันทึกน้ำหนักที่ได้เป็น $W_1$

14. นำ crucible ไปเผาในเตาอบที่อุณหภูมิ ประมาณ 500 องศาเซลเซียส นานประมาณ 3 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักเป็น $W_2$

**การคำนวณ**

$$\text{ร้อยละของ crude fiber} = \frac{(W_1-W_2)*100}{W}$$

เมื่อ $W_1$ คือ ปริมาณของ crude fiber กับเถ้า

$W_2$ คือ ปริมาณ ของเถ้าที่เหลือหลังจากการเผา

$W$ คือ น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น

1.4 การวิเคราะห์เถ้า

**วิธีวิเคราะห์เถ้าโดยวิธีแห้ง** (Dry ashing)

การหาปริมาณเถ้าทั้งหมด (Total ash) ทำได้ดังนี้

1. ชั่งน้ำหนักถ้วยกระเบื้องพร้อมฝา (Porelain crucible) ซึ่งผ่านการเผาในเตาเผา (Muffle furnace) ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จนกระทั่งน้ำหนักคงที่แล้วบันทึกน้ำหนัก

2. ตักตัวอย่างใส่ลงในถ้วยกระเบื้องประมาณ 3-5 กรัม ปิดฝา บันทึกน้ำหนัก

3. วางถ้วยตัวอย่างลงบนเตา Hot plate เปิดฝาออก ค่อยๆ เพิ่มระดับความร้อนในการเผาไหม้ตัวอย่าง (ขั้นตอนนี้ต้องทำในตู้ดูดควัน) จนกระทั่งเผาไหม้หมดควัน

4. นำถ้วยตัวอย่างที่ปิดฝาใส่ในเตาเผา (Muffle furnace) เผาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนกว่าจะได้เถ้าสีขาวหรือเทา

5. นำถ้วยตัวอย่างออกมาใส่ในตู้อบลมร้อน 1 ชั่วโมง แล้วนำออกวางในโถดูดความชื้นตามลำดับ เพื่อค่อย ๆ ลดอุณหภูมิของตัวอย่างลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง

6. ชั่งถ้วยตัวอย่างพร้อมฝา บันทึกน้ำหนัก

7. คำนวณปริมาณเถ้า

$$\text{เถ้าทั้งหมด (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้า} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

1.5 การวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรต โดยการนำค่าในข้อ 1.1-1.5 ลบจาก 100 (AOAC, 1995)

1.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลทั้งหมด โดยวิธี Folin-Ciocalteu (Wu et al., 2006)

**การเตรียมตัวอย่าง**

นำผลแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดง (H. costaricensis) ล้างให้สะอาด ปอกเปลือก และนำเนื้อมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ

**การสกัดสารจากเนื้อแก้วมังกร**

นำเนื้อแก้วมังกรที่ได้มาปั่นรวมกับตัวทำละลาย (น้ำปล่า) ในอัตราส่วนของเนื้อ : ตัวทำละลาย เท่ากับ 1 : 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ เก็บสารสกัดที่ได้ในที่มืดโดยการห่อภาชนะบรรจุด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ และนำไปแช่ไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิ 5-10 องศาเซลเซียส) จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ต่อไป

**หาปริมาณสารฟีนอลทั้งหมด** (total phenolic contents)

การหาปริมาณ total phenolic ของตัวอย่างผลสดแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดง โดยละลายกรดแกลลิค 0.0200 กรัม ด้วยแอลกอฮอล์ (ร้อยละ 95) ปรับปริมาตรจนได้ 50 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร จะได้สารละลายที่มีกรดแกลลิคที่มีความเข้มข้น 0.4 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ซึ่งจะใช้เป็น working standard ปิเปตสารละลายกรดแกลลิคที่เตรียมได้ลงในหลอดทดลอง โดยให้มีปริมาณกรดแกลลิค 0.140 ไมโครกรัม และเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเป็น 10 มิลลิลิตร ต่อจากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteau หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่

อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที และเติมสารละลาย Sodium carbonate ร้อยละ 10 หลอดละ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ อีก 10 นาที เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินที่เกิดขึ้น ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และใช้สารละลายหลอดที่ 1 เป็น blank

นำผลที่ได้ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณของกรดแกลลิคได้เป็นกราฟมาตรฐาน (standard curve)

**การคำนวณปริมาณฟีนอลทั้งหมด**

**สูตรการหาปริมาณสารฟีนอลทั้งหมด**

สมการจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค

$y = 0.0039x + c$ ; $R^2 = 0.9941$

เมื่อ $y$ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง ที่ความยาวคลื่น 730 nm

$x$ = ปริมาณสารฟีนอลทั้งหมด (ไมโครกรัม/0.5มิลลิลิตร)

$c$ = จุดตัดแกน y เท่ากับ 0

**ตัวอย่างการคำนวณ**

**สารสกัดจากตัวอย่างจากแก้วมังกรเนื้อแดงโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย**

ที่ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 nm ที่ความเข้มข้น 20 ppm

ปริมาณสารสกัดจากแก้วมังกรเนื้อแดง 0.5 มิลลิลิตร

ค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.1684

แทนค่าสูตร $0.1684 = 0.0039\,x$

$x$ = 43.19 ไมโครกรัม/0.5 มิลลิลิตรของสารสกัดตัวอย่าง

สารสกัดตัวอย่างมีปริมาณสารฟีนอลทั้งหมด

= 8,638 ไมโครกรัม/100 มิลลิลิตรของสารสกัดตัวอย่าง

(สารสกัดตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร เท่ากับ ปริมาณแก้วมังกรเนื้อแดง 20 กรัม)

สารสกัดตัวอย่างมีปริมาณสารฟีนอลทั้งหมด

= 8,638 ไมโครกรัม/20 กรัม แก้วมังกรเนื้อแดง

สารสกัดตัวอย่างมีปริมาณสารฟีนอลทั้งหมด

= 43,190 ไมโครกรัม/100 กรัม แก้วมังกรเนื้อแดง

ดังนั้น สารสกัดจากแก้วมังกรเนื้อแดงโดยน้ำกลั่นมีปริมาณสารฟีนอลทั้งหมด

= 43.19 มิลลิกรัม/100 กรัม แก้วมังกรเนื้อแดง

1.7 ปริมาณเบต้าไซยานิน

**หาปริมาณเบต้าไซยานินจากแก้วมังกรเนื้อแดง**

นำสารสกัดจากเนื้อแก้วมังกรมาวัดปริมาณเบต้าไซยานิน โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณเบต้าไซยานินในสารสกัดแต่ละตัวอย่างโดยใช้ค่า Extraction coefficient ของเบต้าไซยานิน รายงานผลเป็นมิลลิกรัม/เปลือกแก้วมังกรตัวอย่าง 100 กรัม

**สูตรการคำนวณปริมาณเบต้าไซยานิน**

A = abc

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง ที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร

a = ค่า Extraction coefficient ของเบต้าไซยานินที่ 538 นาโนเมตร ($E1_{cm.}^{1\%}$) เท่ากับ 1120

b = ความกว้างของเซลล์ (คิวเวต) 1 เซนติเมตร

c = ปริมาณเบต้าไซยานินในสารสกัดตัวอย่าง (กรัม)

**ตัวอย่างการคำนวณ**

**สารสกัดจากตัวอย่างเนื้อแก้วมังกรแดงโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย**

ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 nm

สารสกัดจากแก้วมังกรเนื้อแดงที่ระดับการเจือจาง 10 เท่า

ค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.293

แทนค่าสูตร $0.293 = 1120 \times 1 \times c$

$c = 2.62 \times 10^{-4}$ กรัม

สารสกัดตัวอย่างมีระดับการเจือจาง 10 เท่า มีปริมาณเบต้าไซยานิน = $2.62 \times 10^{-4}$ กรัม

สารสกัดตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นปกติ มีปริมาณเบต้าไซยานิน = $2.62 \times 10^{-3}$ กรัม

(ระดับความเข้มข้นปกติของสารสกัดที่ได้จากแก้วมังกรเนื้อแดง 20.00 กรัม)

= $2.62 \times 10^{-3}$ กรัม / 20 กรัม แก้วมังกรเนื้อแดง

ดังนั้น น้ำกลั่นสามารถสกัดเบต้าไซยานินจากแก้วมังกรเนื้อแดง

= 13.10 มิลลิกรัม / 100 กรัม แก้วมังกรเนื้อแดง

1.8 **การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช หรือ** DPPH redical scavenging activity

**ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ** (antioxidant activity) **วิเคราะห์โดยวิธี** DPPH **คือ** นำตัวอย่าง 0.3 กรัม ปั่นผสมด้วยเครื่องสับผสม (blender) ใน methanol 50 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองด้วยกระดาษ whatman เบอร์ 4 นำส่วนใสที่ได้ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติม DPPH ใน methanol 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 60 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) โดยใช้เมทานอลเป็น blank คำนวนหาร้อยละของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)

จากสูตร

$$AA\,(\%) = \frac{\text{Abs control} - \text{Abssample}}{\text{Abs control}} \times 100$$

Abs control ค่าการดูกลืนแสงของสารลาย DPPH ในเมทานอล 0.1 มิลลิโมลาร์

Abs sample ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

**การคำนวณหา ดีพีพีเอช แอคติวิตีการต้านอนุมูลอิสระ หรือ** DPPH redical scavenging activity

**สูตร**

$$AA\,(\%) = \frac{Abs_{control} - Abs_{sample}}{Abs_{control}} \times 100$$

AA (%) = % inhibition ของ ค่าการดูดกลืนแสง DPPH

$Abs_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ในเมทานอล 0.1 มิลลิโมลาร์

$Abs_{sample}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

**หมายเหตุ** blank คือ เมทานอล

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร

1.9 **การวิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่าง** โดยเครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Consort Model C830, Consort, NV., Belgium)

**เครื่องมือ** pH meter (Horiba Nodel F-21)

**วิธีการใช้เครื่องมือ**

1. เตรียมตัวอย่างผสมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 1 ทำการเปิดเครื่องโดยกดปุ่ม CAL + CLR เพื่อเป็นการคาริเบรท (Calibrate) เครื่องก่อนใช้งาน

2. จุ่ม Probe ลงในสารละลายที่มี pH 7.0 แล้วกดปุ่ม CAL อีกครั้ง รอจนตัวเลข 7.0 แสดงขึ้นบนหน้าจอ ล้างน้ำกลั่น

3. จุ่ม Probe ลงในสารละลายที่มี pH 4.0 แล้วกดปุ่ม CAL อีกครั้ง รอจนตัวเลข 4.0

4. จุ่ม Probe ลงในสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัด โดยกดปุ่ม MEAS

5. บันทึกผล

**2. การวิเคราะห์ทางด้านกายภาพ**

2.1 ความหนืด (Chang et al., 1995)

2.1.1 วัดความหนืดของไอศกรีม

2.1.2 นำตัวอย่างไอศกรีมที่มีอายุการบ่ม 24-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.3 นำมาทดสอบความหนืดกับ digital viscometor (Brookfield) ที่ 4 °C 1 นาที

2.1.4 ความเร็วของ(Spindle) แกนหมายเลข 4 ความเร็ว 12 rpm

2.1.5 ค่าความหนืดที่ได้คือ ค่าเฉลี่ยในการหา 3 ครั้ง

**การใช้เครื่อง** Brookfield viscometer (mode DV-II)

1. เปิดเครื่อง

2. ใส่เข็ม (spindle)

3. ปรับปุ่ม Select spindle (ปรับเครื่องให้ตรงกับ spindle ที่ใช้ เมื่อได้แล้วให้กด Select spindle ซ้ำอีกครั้งให้เครื่องรับคำสั่ง)

4. ปรับปุ่ม Set speed โดยพยายามเลือกใช้ spindle แกนหมายเลข 4 ความเร็วรอบ 12 rpm. ซึ่งเป็นความเร็วรอบที่เหมาะสมกับงาน

5. โดยสังเกตค่าความหนืดที่อ่านได้ Cp จะต้องคงที่ไม่แปรปรวนขณะอ่านผลเพื่อให้บันทึกผลง่ายไม่ผิดพลาด

6. จดผลการทดลอง โดยกดปุ่ม Select display หาค่าความหนืดที่ต้องการ

7. เมื่อต้องการวัดตัวอย่างต่อไปให้กดปุ่ม Motor On/Off ให้ spindle หยุดหมุน

แล้วทำการเปลี่ยนตัวอย่าง และทำความสะอาด spindle ซึ่งสามารถถอดออกระหว่างวัดตัวอย่างได้และเมื่อเปลี่ยนตัวอย่างเรียบร้อยแล้วก็เพียงกดปุ่ม Motor On/Off ให้ spindle หมุนและอ่านผลค่าความหนืด

**หมายเหตุ** Cp คือ ความหนืดในหน่วย centipoise

SS คือ Shear strength, SR คือ Shear rate

2.2 ค่าโอเวอร์รัน (A.O.A.C, 1995)

**การวิเคราะห์** overrun

เป็นการหาปริมาตรของอากาศที่ถูกตีให้ผสมเข้ากับเนื้อของไอศกรีม ทำได้โดยนำเอาไอศกรีมตัวอย่างที่ทราบปริมาตร หลังจากนั้นปล่อยให้ไอศกรีมละลายแล้วนำไปดูดไล่อากาศออกให้หมด วัดปริมาตรของไอศกรีมที่เหลือ ปริมาตรที่หายไปเป็นปริมาตรของอากาศที่ถูกตีผสมเข้าไปในเนื้อของไอศกรีม

$$\% \text{ overrun} = \frac{\text{ปริมาตรของไอศกรีม} - \text{ปริมาตรของไอศกรีมที่ปราศจากอากาศ}}{\text{ปริมาตรของไอศกรีมที่ปราศจากอากาศ}} \times 100$$

น้ำหนักของส่วนผสมและน้ำหนักของไอศกรีมจะต้องมีปริมาตรเท่ากัน โดยปกติไอศกรีมจะมี overrun ประมาณ 20-130 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับชนิดของไอศกรีม

2.3 อัตราการละลาย (Gercia et al., 1995)

อัตราการละลายหาได้จาก การนำตัวอย่างไอศกรีมที่แช่แข็งเป็นเวลาต่อเนื่องใส่ในถ้วยStyrofoam® (Dow Chemical Co.) น้ำหนักสุทธิเฉลี่ยทั้งหมด 100 กรัม หลังจากนั้นนำตัวอย่างแต่ละถ้วยเก็บที่อุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส และทิ้งค้างไว้ 1 คืน โดยตัดและเอาออกอย่างระมัดระวังหลีกเลี่ยงอันตรายบนพื้นผิวของไอศกรีม

นำตัวอย่างแต่ละตัวอย่างย้ายมาวางบนลวดตาข่าย เหนือ funnel ที่ยึดโดย ringstand และรองรับด้วยภาชนะตวงทรงกระบอกที่แบ่งออกเป็นขีด ๆ 100 มิลลิลิตร

และย้ายไปบ่มที่ 22 องศาเซลเซียส ตามลำดับการสุ่ม และบันทึกน้ำหนักไอศกรีมที่ละลายทุก 10 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง

2.4 ค่าสี (Hunter Lab, DP9000)

**อุปกรณ์** เครื่อง Hunter LAB Reflectance Tristimulus Colormeter (Hunter LAB รุ่น DP 9000)

**วิธีการใช้เครื่อง**

1. กดปุ่มเครื่อง Warm up เครื่องประมาณ 45 นาที

2. เลือกค่าต่าง ๆ ของเครื่องตามคู่มือการใช้เครื่อง ใส่ตัวอย่างลงใน quartz แล้ววาง quartz บนแท่นวัด ปิดด้วยฝาครอบ

4. กดปุ่ม Read Key สีเขียวเพื่ออ่านค่า

5. ทำการหมุน quartz 4 ซ้ำ

6. บันทึกค่าแต่ละซ้ำ และค่า standard คือ แผ่นเทียบค่าสีของเครื่อง

3. **การวิเคราะห์ทางด้านจุลินทรีย์**

3.1 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

**การตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดในอาหาร**

**สารมาตรฐาน** (Standards)

1. PCA (Plate count agar)
2. Peptone water ร้อยละ 0.1

**วิธีดำเนินงาน** (Procedures)

**วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ**

ละลายเพื่อเจือจางร้อยละ 0.1 เปปโตน

**วิธีการเตรียม**

ชั่งเปบโตน (MERCK) หนัก 1 กรัม ผสมน้ำ 1,000 มิลลิลิตร คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน บรรจุใส่ในภาชนะตามขนาดที่ต้องการ (หลอดทดลองบรรจุ 9 มิลลิลิตร บรรจุขวดแก้วทนร้อน 90 มิลลิลิตร และ 225 มิลลิลิตร)

PCA (Plate count agar) หรือ Standard Method Agar

**ส่วนผสม**

| | | |
|---|---|---|
| Tryptone | 5 | กรัม |
| Yeast extract | 2.5 | กรัม |
| D-glucose | 1 | กรัม |
| Agar | 15 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |
| PH | 7 | |

**วิธีการเตรียม**

ละลายส่วนประกอบทั้งหมด บรรจุใส่ภาชนะตามขนาดที่ต้องการ นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หรือชั่ง PCA 22.5 กรัม (Merck) /น้ำกลั่น 1 ลิตร ละลายและบรรจุใส่ภาชนะและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกัน

วิธีดำเนินการ (Procedures)

1. **วิธีเตรียมตัวอย่าง**

**ตัวอย่างที่เป็นของแข็ง** ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ เติมสารละลายเปบโตนร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ลงในถุง นำไปตีผสมเป็นเวลา 60 วินาที จะได้ตัวอย่างความเจือจาง $10^{-1}$

**ตัวอย่างที่เป็นของเหลว** ใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดซึ่งมีน้ำยาเจือจาง 90 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดเจือจางให้สนิท เขย่าขึ้นลงอย่างแรง 25 ครั้ง จะได้ตัวอย่างความเจือจาง $10^{-1}$

1. ใช้ปิเปตถ่ายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดบรรจุสารละลายเปบโตน 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันปั่นด้วยเครื่องปั่นผสม จะได้ตัวอย่างความเจือจาง $10^{-2}$ จากนั้นทำการเจือจาง ด้วยวิธีเดียวกันจนถึงระดับที่ต้องการ
2. นำตัวอย่างที่ความเจือจางเหมาะสม 3 ระดับ เช่น $10^{-2}$, $10^{-3}$ และ $10^{-4}$ มาปฏิบัติดังนี้

**วิธีพอร์เพลท** (Pour plate)

1. ถ่ายตัวอย่างจากแต่ละความเจือจางในจานเพาะเชื้อปลอดเชื้อ 2 จาน จานละ 1 มิลลิลิตร
2. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่หลอมเหลว อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่าง จานละประมาณ 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการหมุนจานและรอจนวุ้นแข็ง

**วิธีสเปรดเพลท** (Spread plate)

1. ถ่ายตัวอย่างแต่ละความเจือจางลงบนผิวของอาหาร PCA ในจานเพาะเชื้อ 2 จานละ 0.1 มิลลิลิตร
2. ใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อ (เผาด้วยเปลวไฟ ทิ้งไว้ให้เย็น) เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าของอาหารแต่ละจาน
3. บ่มจานเพาะเชื้อ (โดยวางจานแบบคว่ำ) เพื่อเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4. นับจำนวนโคโลนีจากแต่ละจานเพาะเชื้อ หาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีใน 1 จาน และคำนวณ CFU (Colony forming unit) ต่อกรัม ของตัวอย่างที่ได้จากวิธีพอร์เพลท และวิธีสเปรดเพลท

3.2 ปริมาณยีสต์และรา

**การตรวจวิเคราะห์จำนวนยีสต์และรา**

**เครื่องมือที่ใช้** (Equipment and supplies)

1. ตู้อบบ่มเชื้อ (Incubator) ควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
2. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
3. กระดาษวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH)
4. เครื่องชั่ง (Balance)
5. เครื่องแก้ว ได้แก่ petridish, pipette, dilution bottle, glass rod spreader
6. อ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ตั้งอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
7. กรรไกรตัดตัวอย่าง
8. Stomacher bag
9. เครื่องนับโคโลนี
10. รางแช่ปิเปต
11. น้ำยาฆ่าเชื้อสำหรับเช็ดโต๊ะปฏิบัติการ

**สารมาตรฐาน**

1. Rose Bengal agar
2. Peptone water ร้อยละ 0.1

**วิธีดำเนินการ**(Procedures)

**วิธีการเตรียม**

**วิธีเตรียม** Rose bengal agar

ส่วนผสม Peptone 2 กรัม

Dextrose 10 กรัม

$KH_2PO_4$ 1 กรัม

Bengal 0.025 กรัม

Agar 15 กรัม

Streptomycin ร้อยละ 1 ใช้ 0.3 มิลลิลิตร ในอาหาร 100 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน บรรจุใส่ขวดขวดละ 300 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ก่อนเท plate เติม Streptomycin ร้อยละ 1 ใช้ 0.3 มิลลิลิตร ในอาหาร 100 มิลลิลิตร

**วิธีดำเนินการ**

1. วิธีเตรียมตัวอย่าง

**ตัวอย่างที่เป็นของแข็ง** ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ เติมสารละลายเปบโตน ร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ลงในถุง นำไปตีผสมเป็นเวลา 60 วินาที จะได้ตัวอย่างความเจือจาง $10^{-1}$

**ตัวอย่างที่เป็นของเหลว** ใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดซึ่งมีน้ำยาเจือจาง 90 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดเจือจางให้สนิท เขย่าขึ้นลงอย่างแรง 25 ครั้ง จะได้ตัวอย่างความเจือจาง $10^{-1}$

1. ใช้ปิเปตถ่ายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดบรรจุสารละลายเปบโตน 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันปั่นด้วยเครื่องปั่นผสม จะได้ตัวอย่างความเจือจาง $10^{-2}$ จากนั้นทำการเจือจาง ด้วยวิธีเดียวกันจนถึงระดับที่ต้องการ

2. นำตัวอย่างที่ความเจือจางเหมาะสม 3 ระดับ เช่น $10^{-2}$, $10^{-3}$ และ$10^{-4}$ มาปฏิบัติดังนี้

2.1 วิธีสเปรดเพลท (Spread plate)

2.1.1 ถ่ายตัวอย่างแต่ละความเจือจางลงบนผิวของอาหาร Rose bengal agar หรือ PDA ในจานเพาะเชื้อ 2 จาน จานละ 0.1 มิลลิลิตร

2.1.2 ใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อ (เผาด้วยเปลวไฟ ทิ้งไว้ให้เย็น) เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าของอาหารแต่ละจาน

2.2 บ่มจานเพาะเชื้อ (โดยวางจานแบบคว่ำ) เพื่อเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.3 นับจำนวนโคโลนีจากแต่ละจานเพาะเชื้อ หาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีใน 1 จาน และคำนวณ CFU (Colony forming unit) ต่อกรัม ของตัวอย่างที่ได้จากวิธีสเปรดเพลท

**การคำนวณ**

วิธีสเปรดเพลท ซึ่งใช้ตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตรมาเพาะเชื้อ ค่า CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร หาได้จากความสัมพันธ์ดังนี้

CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร = $n / d / 10$

หรือ $= n \times df \times 10$

เมื่อ n คือจำนวนโคโลนีเฉลี่ยใน 1 จาน ของจานที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 25-250 โคโลนีต่อจาน

df คือ dilution factor หรือส่วนกลับของความเจือจาง

3.3 การตรวจวิเคราะห์จำนวน Staphylococcus aureus ในอาหาร

**เครื่องมือเครื่องใช้** (Equipment and supplies)

1. ตู้อบบ่มเชื้อ (Incubator) ควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
2. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
3. กระดาษวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH)
4. เครื่องชั่ง (Balance)
5. เครื่องแก้ว ได้แก่ petridish, pipette, dilution bottle, glass rod spreader
6. หลอดดักก๊าซ (Durham tube)
7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
8. กรรไกรปลอดเชื้อ
9. ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ (stomacher bag)
10. ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
11. น้ำยาฆ่าเชื้อสำหรับเช็ดโต๊ะปฏิบัติการ

**สารมาตรฐาน** (Standard)

**วิธีการดำเนินงาน** (Procedures)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

NA (Nutrient agar)

**ส่วนผสม**

| | | |
|---|---|---|
| Peptone from meat | 5.0 | กรัม |
| Meat extract | 3.0 | กรัม |
| agar-agar | 12.0 | กรัม |

**วิธีการเตรียม**

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับพีเอชเป็น 7.4 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

Monnitol Salt Phenol-red agar

**ส่วนผสม**

| | | |
|---|---|---|
| Peptone | 10.0 | กรัม |
| Meat extract | 1.0 | กรัม |
| Sodium chloride | 75.0 | กรัม |
| D(-)mannital | 10.0 | กรัม |
| Phenol red | 0.025 | กรัม |
| Agar | 12 | กรัม |

**วิธีเตรียม**

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับพีเอชเป็น 7.4 ปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็นจนมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อ

**การตรวจวิเคราะห์ Staphylococcus aureus**

การตรวจหา Staphylococcus aureus ในอาหารหรือวัสดุอื่นที่ใช้ประกอบอาหาร ถ้ามีเชื้อก็แสดงถึงคุณภาพการสุขาภิบาลของอาหารนั้นไม่ดี (poor quality of food sanitation) มักมีการปนเปื้อนหลังการประกอบอาหาร ซึ่งเกิดได้จากการสัมผัส การไอ หรือจามของผู้ประกอบการอาหารหรือปนเปื้อนมาในขั้นตอนการเก็บรักษาและการขนส่งอาหาร ถ้าพบ S. aureus จำนวนมาก ๆ ในอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูป (processed food) อาจบ่งบอกถึงการใช้ความร้อน ไม่เพียงพอในกระบวนการฆ่าเชื้อด้วย อย่างไรก็ตามการสรุปว่าอาหารเป็นพิษเกิดจากเชื้อดังกล่าวนี้ จะต้องตรวจสารพิษของเชื้อในอาหาร หรือพิสูจน์ได้ว่า เชื้อที่แยกได้จากอาหารนั้นผลิตสารพิษเกิดจากเชื้อดังกล่าวนี้ จะต้องตรวจสารพิษของเชื้ออาหาร หรือพิสูจน์ได้ว่า เชื้อที่แยกได้จากอาหารนั้นผลิตสารพิษ

การตรวจหาเชื้อ S. aureus มี 2 วิธีคือ

1. Direct Plate Count Method

เป็นวิธีตรวจนับจำนวนเชื้อในอาหารเหมาะสำหรับอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อน > 100 CFU/กรัม ได้แก่อาหารสด อาหารที่ไม่ได้ผ่านความร้อนสูง หรืออาหารที่มีการปนเปื้อนสูง

**วิธีการตรวจหา**

**ชั่งตัวอย่าง 25 กรัมใน** peptone water **ร้อยละ** 0.1 **จำนวน** 225 ml

⇓

เจือจางต่อให้ได้ 1:10, 1:100,1:1000

⇓

ปิเปต 1 มิลลิลิตร ของทุก dilution ลงใน Mannitol salt agar + egg yolk ร้อยละ 3 เพลท

(0.4, 0.3 และ 0.2 มิลลิลิตร)

⇓

เกลี่ยให้กระจายทั่วเพลท ด้วยแท่งแก้วโค้งงอ

⇓

ปิดฝาเพลทและวางหงายไว้ให้หน้าเพลทแห้งประมาณ 10 นาที

⇓

คว่ำเพลท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส, 45-48 ชั่วโมง

⇓

เลือกเพลทที่มีลักษณะเฉพาะของโคโลนี S. aureus จำนวน 20-200 โคโลนีมานับ

⇓

เลือกโคโลนี S. aureus 1 โคโลนี หรือมากกว่ามาทดสอบ Coagulase test

**หมายเหตุ**

ตัวอย่างอาหารที่ผ่านความร้อนในการฆ่าเชื้อมาแล้ว หรือตัวอย่างที่มีโอกาสการปนเปื้อน S. aureus น้อยจึงเลือกใช้ Mannitol salt agar + egg yolk ร้อยละ 3 แทน Baird Parker agar จะให้โคโลนีเฉพาะของ S. aureus สีเหลืองมีวงโดยรอบสีขาวขุ่น

**Coagulase test**

ใช้ loop แตะโคโลนี S. aureus ใส่ลงในหลอดที่มี BHI broth อยู่ 0.2-0.3 มิลลิลิตร

⇓

บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง

⇓

เติม Coagulase plasm ลงไป 0.5 มิลลิลิตร, เขย่า

⇓

บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง ตรวจดูการแข็งตัวของ พลาสมา (clotting)
ถ้าพลาสมายังไม่แข็งตัวให้บ่มต่อไปแล้วดูผลภายใน 24 ชั่วโมง ลังจากนี้แล้วให้ตัดทิ้งได้

⇓

รายงานผล Coagulase positive (เฉพาะ 3+ และ 4+ ; 1+ และ 2+ ไม่ถือว่า positive)

ลักษณะการแข็งตัวของพลาสมา มี 4 แบบ (1+, 2+, 3+, 4+)

1+ พลาสมาเริ่มแข็งตัวแต่ยังไม่เป็นก้อน

2+ พลาสมาแข็งตัวเป็นก้อนเล็ก

3+ พลาสมาแข็งตัวเป็นก้อนใหญ่ แต่ยังมีบางส่วนที่ไม่แข็งตัวเหลืออยู่

4+ พลาสมาแข็งตัวทั้งหมด เมื่อคว่ำหลอดก็ยังเกาะก้อนหลอดอยู่เหมือนเดิม

**การทดสอบยืนยันเพิ่มเติม**

1. ย้อม Gram stain ได้แกรมบวกรูปร่างกลมอยู่กันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น

2. catalase test โดยหยด $H_2O_2$ ลงในโคโลนีของเชื้อ ตรวจสอบการเกิดฟองแก๊ส รายงานให้ผลบวก

3. anaerobic utilization glucose ให้ผลบวก เพาะเชื้อใน phenol red broth ที่มีน้ำตาลผสมอยู่แล้วปิดทับผิวหน้าอาหารนั้นด้วย พาราฟินเหลวหนาประมาณ 2.5 เซนติเมตร บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส ดูการสร้างกรด ผลบวก : broth เปลี่ยนจากน้ำเงินเป็นสีเหลือง

**ตาราง 26 ปฏิบัติชีวเคมีเพื่อแยกเชื้อ S. aureus**

| | S. aureus | S. epidermidis | Micrococcus sp. |
|---|---|---|---|
| Catalase test | + | + | + |
| Coagulase test | + | - | - |
| Anarobic utilization of | | | |
| - glucose | + | + | - |
| - manital | + | - | - |

**ที่มา** Modern Food Microbiology (1927, p.456)

**การรายงานผล**

นับจำนวนโคโลนี S. aureus ทั้งหมดในหนึ่ง dilution (รวม 3 เพลท) คูณด้วย dilution factor รายงานเป็น CFU/กรัม

3.4 **การตรวจวิเคราะห์จำนวน Clostridium perfringens ในอาหาร**

**เครื่องมือที่ใช้** (Equipment and supplies)

1. ตู้อบบ่มเชื้อ (Incubator) ควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
2. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
3. กระดาษวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH)
4. เครื่องชั่ง (Balance)
5. เครื่องแก้ว ได้แก่ petridish, pipette, dilution bottle, glass rod spreader
6. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
7. กรรไกรปลอดเชื้อ
8. ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ (stomacher bag)
9. ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
10. น้ำยาฆ่าเชื้อสำหรับเช็ดโต๊ะปฏิบัติการ

**สารมาตรฐาน**

**วิธีดำเนินการ** (Procedures)

**การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ**

**วิธีการเตรียม**

TSC (Tryptose sulphite egg-yolk cycloserine agar)

**ส่วนผสม**

| | | |
|---|---|---|
| Tryptose | 15.0 | กรัม |
| Peptone from soymeal | 5.0 | กรัม |
| Yeast extract | 5.0 | กรัม |
| Sodium disulfite | 1.0 | กรัม |
| Ammonium-iron (III) | 1.0 | กรัม |
| Agar | 15.0 | กรัม |

**วิธีการเตรียม**

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับพีเอชเป็น 7.4 ด้วย 0.1 N NaOH ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็นจนมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้เติม cycloserine 0.4 กรัมต่อลิตร หรือ Polymyxin sulfate 3 มิลลิกรัม และ Kanamycin sulfate 12 มิลลิกรัม

**วิธีการวิเคราะห์**

ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใน Peptone diluent (peptone ร้อยละ 0.1) 225 มิลลิลิตร

(เจือจาง 1:10)

⇓

ทำการเจือจางให้ได้ $10^{-1}$ ถึง$10^{-3}$

⇓

เท 6-7 มิลลิลิตร TSC ลงในเพลท

⇓

วางไว้ให้ Agar แข็งตัว

ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ทุก dilution ลงในเพลททำซ้ำ dilution ละ 2 เพลท

⇓

เท TSC 15 มิลลิลิตร ลงในเพลท แล้วหมุนเบาๆให้ agar ผสมกับตัวอย่างให้ทั่ว

⇓

ทิ้งไว้ให้ Agar แข็งตัว นำเพลทไปใส่ใน Anaerobic jar

⇓

บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส, 20-24 ชั่วโมง

⇓

เลือกเพลทที่มีโคโลนีสีดำ 25-250 โคโลนี นำมานับรายงานเป็น Clostridia cell ต่อกรัม

**นำไปทดสอบยืนยันต่อ**

**การตรวจยืนยันในขั้นตอน**

เลือกโคโลนีสีดำบน TSC 10 โคโลนี

ใช้ loop แตะโคโลนีแล้วใส่ใน fluid thioglucolate

Broth ที่ต้มไล่อากาศออกแล้ว หลอดละ 1 โคโลนี

⇓

บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส,18-24 ชั่วโมง

⇓

ปิเปต 1 มิลลิลิตร ของ fluid thioglucolate broth ที่บ่มแล้วใน iron-milk medium

⇓

บ่มที่ 46 องศาเซลเซียส, ใน water bath 2 ชั่วโมง

⇓

ตรวจดูการเกิด stormy fermentation ทุกชั่วโมง (นมจะจับตัวกันเป็นก้อน)

อาจรายงานว่าเป็น C. perfringens โดยไม่ต้องทดสอบยืนยันในขั้นสมบูรณ์

**หมายเหตุ** ในกรณีที่ให้ผล stormy fermentation + vc หลังจาก 5 ชั่วโมง แล้ว หรือในการศึกษาเพื่อหาสาเหตุของเชื้อที่มีการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษเกิดขึ้น ต้องทดสอบยืนยันในขั้นสมบูรณ์ต่อไป

**การทดสอบยืนยันขั้นสมบูรณ์**

ใส่ thioglycollate broth ที่บ่มเชื้อไว้แล้ว 2 loop

ลงใน motility-nitrate และ lactose-gelatin medium

(stab หลายๆครั้ง)

⇓

บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส, 24 ชั่วโมง

⇓

ตรวจผล C. perfringens

**ผลการทดสอบ**

Lactose gelatin medium : -

**Lactose+** : ดูการสร้างแก๊ซและกรดโดยสี media จะเปลี่ยนจากแดงเป็นเหลือง

**Gelatin ไม่แข็งตัว** : ดูผลการไม่แข็งตัวของ gelatin โดยนำหลอดทดสอบไปแช่เย็นที่ 5 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง Gelatin จะไม่แข็งตัว ถ้า gelatin แข็งตัวให้นำไปบ่มต่อที่ 35 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง แล้วดูผลอีกครั้ง

Motility-nitrate medium : -

Motility - : เชื้อเจริญตามรอย stab เท่านั้น ไม่แผ่กระจายโดยรอบ medium

Nitrate + : สีส้ม

**การทดสอบ** เติม reagent A 0.5 มิลลิลิตร และ reagent B 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบ จะได้สีส้มภายใน 5 นาที ถ้าไม่มีสีม่วงให้เติมผง zine metal ลงไป รอ 2-3 นาที ถ้าไม่เห็นสีอีกจึงให้ผล + vc เห็นสีแดงจะเห็นเป็นผล - vc

**การรายงานผล**

จำนวนโคโลนี/กรัมของอาหาร = A x C/B x D x10

A = จำนวนโคโลนีที่นับได้ทั้งหมดเฉลี่ยต่อ 1 เพลท

B = จำนวนโคโลนีที่เลือกมาทดสอบ

C = จำนวนโคโลนีที่ให้ผลถูกต้อง

D = Dilution factor เช่น เลือกเพลทของ dilution $10^{-3}$, D = 103

X 10 หมายถึง ตัวอย่างเริ่มต้นเจือจางที่ 1 : 10

**การทำ** Spore count

ทดสอบตามแบบ Direct plate method แต่หลังจากใส่ตัวอย่าง 25 กรัม ลงใน peptone 225 มิลลิลิตร แล้วให้แบ่งตัวอย่างใส่ใน screw cap tube แล้วแช่ใน water bath อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส, 20 นาที แล้วจึงนำไปทำ dilution และลงเพลทต่อไป

**Detection method (การตรวจเพื่อรายงานว่าพบหรือไม่พบ)**

ใช้ในกรณีที่ตัวอย่างอาหารมีโอกาสปนเปื้อนด้วย <u>C. perfringens</u> น้อย

ชั่งตัวอย่าง 2 กรัมลงในหลอดที่มี Liver infusion broth 10-20 มิลลิลิตร

(ใส่ durham tube ในหลอดด้วย)

⇓

บ่มที่ 35-37 องศาเซลเซียส 20-24 ชั่วโมง

⇓

เลือกหลอดที่ขุ่นและให้แก๊ซ

⇓

Steak บน TSC agar ที่เติม egg yolk ร้อยละ 8

⇓

บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

⇓

เลือกโคโลนีที่มีสีเทาแกมเหลือง (yellowish gray)

ขนาด 1-2 มิลลิเมตร โคโลนีล้อมรอบด้วยวงขาวขุ่น

เนื่องจากมีการย่อยของไข่แดง (lecthinase production)

⇓

ใช้ loop แตะโคโลนีใส่ลงใน fluid thioglycolate broth

⇓

บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง

⇓

นำไปทดสอบยืนยันต่อไปเหมือนวิธีการตรวจนับ

⇓

รายงานผลเป็นพบหรือไม่พบ (detected or not detected)

3.5 การตรวจหา <u>Sallmonella</u> ในอาหาร

**เครื่องมือที่ใช้ (Equipment and supplies)**

1. ตู้อบบ่มเชื้อ (Incubator) ควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และ 42 องศาเซลเซียส
2. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
3. กระดาษวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH)
4. เครื่องชั่ง (Balance)

5. เครื่องแก้ว ได้แก่ petridish, pipette, dilution bottle, glass rod spreader
6. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
7. กรรไกรปลอดเชื้อ
8. ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ (stomacher bag)
9. ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
10. น้ำยาฆ่าเชื้อสำหรับเช็ดโต๊ะปฏิบัติการ

**วิธีดำเนินการ(Procedures)**

**การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ**

Salmonella-Shigella agar

**ส่วนผสม**

| | | |
|---|---|---|
| 1. | Peptones | 10.0 กรัม |
| 2. | Lacrtose | 10.0 กรัม |
| 3. | Ox bile dried | 8.5 กรัม |
| 4. | Sodium thiosulfate | 8.5 กรัม |
| 5. | Ammonium iron (III) citrate | 1.0 กรัม |
| 6. | Brilliant green | 0.0003 กรัม |
| 7. | Neutral red | 0.025 กรัม |
| 8. | Agar-agar | 12.0 กรัม |

**วิธีการตรวจหา Salmonella ในอาหาร**

การตรวจสอบเชิงคุณภาพเพื่อหาว่าอาหารชนิดหนึ่ง ๆ มี Salmonella ปนเปื้อนอยู่หรือไม่ ประกอบด้วยขั้นตอนโดยทั่วไปเช่นเดียวกับการตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคในอาหารชนิดอื่นดังนี้

1. **การเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชนิดไม่คัดเลือก**

ขั้นตอนนี้มีความจำเป็นสำหรับตัวอย่างอาหารแห้งหรืออาหารที่ผ่านกรรมวิธีแปรรูป เช่นไข่ผง เนยแข็ง นมผง ผักและผลไม้แช่เยือกแข็ง อาหารเหลวชนิดไม่คัดเลือกที่นิยมใช้ฟื้นเซลล์ Salmonella ได้แก่ lactose broth, trypticase soy broth และ buffered peptone water เป็นต้น อาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ไม่มีส่วนผสมที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ แต่ช่วยทำให้เซลล์ Salmonella ที่อ่อนแอหรือบาดเจ็บฟื้นตัวขึ้น

2. **การเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชนิดคัดเลือก**

ขั้นนี้เป็นการถ่ายเชื้อจากอาหารเหลวชนิดไม่คัดเลือก หรือเพาะเชื้อโดยตรงจากตัวอย่างที่คาดว่ามีการปนเปื้อนของ Salmonella สูง เช่น เนื้อดิบหรือขยะ ลงในอาหารเลี้ยง

เชื้อเหลวซึ่งมีส่วนประกอบที่ช่วยเสริมการเจริญของ Salmonella และมีส่วนประกอบที่ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น ตัวอย่างของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดเลือก Salmonella ได้แก่ selenite cystine broth และ tetrathionate broth เป็นต้น

**3. การเพาะแยกเชื้อบนอาหารแข็งชนิดคัดเลือก**

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพาะแยก Salmonella มักมีส่วนประกอบของสี (dyes) เกลือน้ำดี (bile salts) และสารประกอบบางชนิดที่ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น และมีส่วนประกอบที่ใช้แสดงสมบัติของ Salmonella เช่น การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ และการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ เป็นต้น ตัวอย่างของอาหารแข็ง เหล่านี้ ได้แก่ MacConkey agar, brilliant green agar, bismuth sulphite agar, Salmonella Shigella agar, desoxycholate citrate agar และ xylose lysine desoxycholate agar เป็นต้น เมื่อ Salmonella เจริญบนอาหารแข็งดังกล่าว จะให้โคโลนีลักษณะเฉพาะ เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้มีระดับความแรงในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ไม่เท่ากัน ดังนั้นในทางปฏิบัติจึงเลือกใช้อาหารแข็งเหล่านี้อย่างน้อย 2 ชนิด ที่มีระดับการยับยั้งต่างกัน เพื่อทำให้โอกาสในการแยกเชื้อ Salmonella สูงขึ้น

**ตาราง 27 ลักษณะโคโลนีของ Salmonella บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดคัดเลือก**

| อาหารเลี้ยงเชื้อ | ระดับการยับยั้ง | ลักษณะโคโลนี |
|---|---|---|
| MacConkey agar | ต่ำ | ไม่มีสี ทึบแสงเล็กน้อย |
| Brilliant green agar | สูง | สีแดงหรือชมพู โปร่งแสง หรือทึบแสง มีวงสีแดงเข้มล้อมรอบ |
| Desoxycholate citrate agar | ปานกลาง | ไม่มีสี ทึบแสงเล็กน้อย นูน มีจุดสีดำ หรือไม่มี |
| Xylose lysine desoxycholate agar | ค่อนข้างต่ำ | สีแดง มีจุดสีดำหรือไม่มี |
| Bismuth sulphite agar | สูง | สีน้ำตาล ดำ หรือสีเขียว มีเงาโลหะ หรือไม่มีรอบโคโลนีมีสีดำ |
| Salmonella-Shigella agar | สูง | ไม่มีสี หรือชมพูจาง มีจุดสีดำหรือไม่มี |

**ที่มา** Modern Food Microbiology (1927, p.555)

**4. การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี (biochemical test)**

ขั้นนี้เป็นการตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมีที่สำคัญของโคโลนีมีลักษณะของ Salmonella ที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดคัดเลือก เพื่อจำแนกเชื้อเบื้องต้น อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบได้แก่

4.1 triple sugar iron agar สำหรับการทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และแล็กโทส และการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์

4.2 lysine iron agar สำหรับการทดสอบการผลิตไลซีนดีคาร์บอกซิเลส และไฮโดรเจนซัลไฟด์

4.3 Urea agar สำหรับทดสอบการผลิตยูริเอส

อาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดนี้เตรียมอยู่ในอาหารเอียง (slant) และ Salmonella ส่วนใหญ่จะให้ผลการทดสอบ ดังตาราง 28

**ตาราง 28 การทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นเพื่อจำแนก** Salmonella

| อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ | การเปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเจริญของ Salmonella | การจำแนก | การบันทึกผล |
|---|---|---|---|
| Triple sugar iron Agar | - ส่วนเอียงมีสีแดง<br>- ส่วนก้นมีสีเหลือง<br>- วุ้นมีรอยแตก<br>- มีสีดำ | - ไม่หมัก lactose และ sucrose<br>- หมัก glucose<br>- ผลิตก๊าซ<br>- ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ | Alkaline (K) Slant<br>Acid (A) bult<br>Gas +<br>$H_2S$ + |
| Lysine iron Agar | - เปลี่ยนเป็นสีม่วง<br>- มีสีดำ | - ผลิตไลซีนดีคาร์บอกซิเลส<br>- ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ | LDC +<br>$H_2S$ + |
| Urea Agar | ไม่เปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง | ไม่ผลิตยูริเอส | - |

**ที่มา** Modern Food Microbiology (1927, p.558)

ในกรณีที่การทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นดังกล่าวแสดงผลของ Salmonella ควรทำการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อยืนยันโดยการเลือกจากตารางดังต่อไปนี้

**ตาราง 29 การทดสอบทางชีวเคมีเพิ่มเติมสำหรับจำแนก Salmonella**

| การทดสอบ | ผลการทดสอบของ Salmonella |
|---|---|
| การเจริญใน KCN broth | + |
| อินโดล (Indole) | - |
| เอ็มอาร์ (MR test) | + |
| วีพี (VP test) | - |
| การใช้น้ำตาลแล็กโทส | - |
| การใช้น้ำตาลซูโครส | - |

**ที่มา** Modern Food Microbiology (1927, p.559)

3.6 การตรวจวิเคราะห์จำนวน Coliforms และ Escherichia coli

**เครื่องมือที่ใช้** (Equipment and supplies)

1. ตู้อบบ่มเชื้อ (Incubator) ควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และ 44.5 องศาเซลเซียส
2. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
3. กระดาษวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH)
4. เครื่องชั่ง (Balance)
5. เครื่องแก้ว ได้แก่ petridish, pipette, dilution bottle,glass rod spreader
6. หลอดดักก๊าซ (Durham tube)
7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
8. กรรไกรปลอดเชื้อ
9. ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ (stomacher bag)
10. ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
11. น้ำยาฆ่าเชื้อสำหรับเช็ดโต๊ะปฏิบัติการ

**วิธีดำเนินการ** (Procedures)

**การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ**

Lauryl sulphate tryptose broth (LST)

**ส่วนผสม**

| | | |
|---|---|---|
| Tryptose peptone | 20.0 | กรัม |
| Lactose | 5.0 | กรัม |
| Dipotassium phosphate | 2.75 | กรัม |
| Sodium chloride | 5.0 | กรัม |
| Sodium lauryl sulfate | 0.1 | กรัม |

PH 6.8 ± 0.2

**วิธีการเตรียม**

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.8 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุในหลอดแก้วขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร และใส่หลอด Durham 1 หลอด (คว่ำหลอด) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

EC Broth

| | | | |
|---|---|---|---|
| **ส่วนผสม** | Peptone from casein | 20.0 | กรัม |
| | Lactose | 5.0 | กรัม |
| | Oxbile dried | 20.0 | กรัม |
| | Brilliant green | 0.0133 | กรัม |

PH 7.2 ± 0.2

**วิธีการเตรียม**

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.9 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร และใส่หลอด Durtham 1 หลอด (คว่ำหลอด) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

**ส่วนผสม**

| | | |
|---|---|---|
| Peptone from casein | 10.0 | กรัม |
| Sodium chloride | 5.0 | กรัม |

PH 7.2 ± 0.2

**วิธีการเตรียม**

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 7 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 13x100 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

**ขั้นตอนดำเนินงาน**

1. **วิธีการตรวจ E. coli**

1.1 การทดสอบขั้นต้น

1.1.1 ชั่งตัวอย่างน้ำหนัก 25 กรัม ใส่ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ เติมสารละลายเปบโตนปริมาตร 225 มิลลิลิตรลงในถุงตัวอย่างนำไปตีผสมด้วยเครื่องเป็นเวลา 60 นาที จะได้ตัวอย่างความเจือจาง $10^{-1}$

1.1.2 ใช้ปิเปตถ่ายตัวเองความเจือจาง $10^{-1}$ ลงในหลอดอาหาร LST broth 3 หลอด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร

1.1.3 ใช้ปิเปตอันใหม่ถ่ายตัวอย่างความเจือจาง $10^{-2}$ ลงในหลอดเปบโตน 9 มิลลิลิตร อีกหลอดหนึ่งผสมให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างความเจือจาง $10^{-3}$ และใช้ปิเปตอันเดิมถ่ายตัวอย่างความเจือจาง $10^{-2}$ ลงในอาหาร LST broth อีก 3 หลอดๆละ 1 มิลลิลิตร

1.1.4 ใช้ปิเปตอันใหม่ถ่ายตัวอย่างความเจือจาง $10^{-3}$ ลงในอาหาร LST broth อีก 3 หลอด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร

1.1.5 บ่มหลอด LST broth ที่มีตัวอย่าง (รวมทั้งหมด 9 หลอด ต่อ 1 ตัวอย่าง) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อ่านผลครั้งแรกหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการณ์เจริญจากความขุ่นและสังเกตการณ์ผลิตก๊าซจนการเกิดฟองอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อและมีที่ว่างในหลอดดักก๊าซ บ่มหลอดที่ไม่ให้ผลบอกต่ออีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอ่านผลเช่นเดียวกันอีกครั้งหนึ่ง

1.2 การทดสอบขั้นยืนยัน

1.2.1 ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อถ่ายจากหลอด LST broth ที่ให้ผลบวกลงในหลอดอาหาร EC broth ทำเช่นเดียวกันจนครบทุกหลอด

1.2.2 บ่มหลอด EC broth ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตรวจผลหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง หลอดที่อ่านผลเป็น ผลบวก อาหารเลี้ยงเชื้อจะขุ่น และมีที่ว่างในหลอดดักก๊าซ

1.2.3 นำค่าจำนวนหลอด EC broth ที่ให้ผลบวกจากทุกความเจือจางไปอ่านค่าปริมาณ E. coli จากตาราง เอ็มพีเอ็นของ E. coli ต่อตัวอย่าง 1 กรัม

1.3 การทดสอบขั้นสมบูรณ์สำหรับ E. coli

1.3.1 นำหลอด EC broth ที่ให้ผลบวกแต่ละหลอดมาขีดแยกเชื้อลงบนจานอาหารแข็ง EMB agar บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.3.2 เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ E. coli บน EMB agar (โคโลนีแบนไม่เยิ้มมีจุดสีเข้ม มีเงาโลหะ) ซึ่งถือเป็นผลบวก

1.3.3 ทำการทดสอบ IMVIC TEST

**การตรวจสอบ** Coliform, Faecal Coliform **และ** E. coli **ตามวิธี** Most Probable Number Technique (MPN)

ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม

⇓

เจือจางด้วย PBSS 225 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้น 1:10,1;100,1:1000

⇓

Pipett 1 มิลลิลิตร ของแต่ละ dilution ใส่ใน LSTdilution ละ 3 หลอด (รวมเป็น9หลอด)

⇓

บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

⇓

**ผลบวกคือ หลอดให้ก๊าซ**

| | |
|---|---|
| ↓ | ↓ |
| ถ่ายลง BGLB | EC broth |
| ↓ | ↓ |
| บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง | แช่ใน water bath, 48 ชั่วโมง |
| ↓ | ↓ |
| ผลบวก คือหลอดก๊าซ | Faecal Coliform = 44.5 องศาเซลเซียส |
| ↓ | ↓ |
| Coliforms โดยอ่านค่าจากตาราง MPN | ผลบวก คือหลอดให้ก๊าซเปิดตาราง MPN |

↓

Streak บน EMB

↓

บ่มที่ 35องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

↓

ได้โคโลนีสีเข้ม ตรงกลางสีเกือบดำมีหรือไม่มีเงาโลหะ (metallic sheen)

↓

ใช้ needle เขี่ยตรงกลางโคโลนีสีดำ
เพาะเชื้อบน PCA slant
บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส
นาน 18-24 ชั่วโมง

| | |
|---|---|
| ทำ IMViC Test | ใช้ Tryptone broth ร้อยละ 1, บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง |
| Indole test | หยด Kovac's solution 3 มิลลิลิตร ผลบวกคือ มีวงแหวนสีแดงเกิดขึ้น |
| Methyl red test (MR.Test) | ใช้ MR-VP medium , บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง<br>หยด methyl red 2-3 หยด ผลบวกคือมีสีแดง ผลลบคือมีสีเหลือง |
| Voges Proskaur (VP test) | ใช้ MR-VP medium , บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง<br>หยด $\alpha$-naphthol solution 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอด KOH solution (KOH 4 กรัม+น้ำ 10 มิลลิลิตร) 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 5-10 นาที ผลบวกมีแดง |
| Citrate | ใช้ Simmons citrate agar slant, บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ผลบวกคืออาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน |

**ภาคผนวก ค หนังสือแสดงความยินยอมการเข้าร่วมโครงการวิจัย และแบบประเมินลักษณะทางประสาทสัมผัส**

(จธ.-01)

## หนังสือแสดงความยินยอมการเข้าร่วมโครงการวิจัย
## กรณีที่อาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยเป็นผู้ที่บรรลุนิติภาวะ

INFORMED CONSENT FORM

การวิจัยเรื่อง การพัฒนาไอศกรีมลดไขมันและพลังงานแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดง (Hylocereus costaricensis) ที่มีแอคติวิตีการต้านอนุมูลอิสระ

วันให้คำยินยอม วันที่..............................เดือน...................................................................พ.ศ. ......................................

ข้าพเจ้า(นาย/นาง/นางสาว)....................................อยู่บ้านเลขที่.......................ซอย ..........................................

.ถนน.................................แขวง/ตำบล...................เขต/อำเภอ.......................................จังหวัด..................................

รหัสไปรษณีย์................บัตรประชาชน/ข้าราชการเลขที่........................................................................

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับเอกสารและคำอธิบายจากผู้วิจัย ถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีวิจัย อันตรายหรืออาการข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัยหรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่เกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด และมีความเข้าใจดีแล้ว ผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่างๆ ที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจ ไม่ปิดบัง ไม่ซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ ข้าพเจ้าอนุญาตให้ผู้วิจัยเปิดเผยข้อมูลเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าได้ตามที่ผู้วิจัยเห็นสมควร ข้าพเจ้าเข้าร่วมโครงการนี้โดยความสมัครใจ และมีสิทธิ์ที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้

ผู้วิจัยและ/หรือผู้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยขอให้คำรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเกี่ยวกับข้าพเจ้าเป็นความลับและจะเปิดเผยเฉพาะในรูปที่เป็นการสรุปการวิจัย โดยไม่ระบุตัวบุคคลผู้เป็นเจ้าของข้อมูล และหากเกิดอันตรายหรือความเสียหายอันเป็นผลจากการวิจัยต่อข้าพเจ้าผู้วิจัยและ/หรือผู้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยจะจัดการรักษาพยาบาลให้จนกลับคืนสภาพเดิมและจะเป็นผู้ออกค่าใช้จ่ายทั้งหมดในการรักษาพยาบาลรวมทั้งชดใช้ค่าเสียหายอื่นถ้าหากมี

ผู้วิจัยแจ้งด้วยว่าข้าพเจ้าสามารถติดต่อกับผู้วิจัย นางสาวขนิษฐา ตั้งสกุล ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก โทรศัพท์ 08-6514-2727

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นแล้ว และมีความเข้าใจดีทุกประการจึงได้ลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ลงนาม.........................................................อาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

( )

**ลงนาม.........................................................ตัวแทนผู้ทำงานวิจัย**

( )

**ลงนาม.........................................................พยาน**

( )

**ลงนาม.........................................................พยาน**

( )

# แบบสอบถาม

**ชื่อผู้ทดสอบ**..........................................................................................................**รหัสผู้ทดสอบ**..................
**วันที่**.......................................................................................................................................................

---

**คำชี้แจง** แบบสอบถามนี้สร้างขึ้นเพื่อประเมินการใช้ประโยชน์ของการพัฒนาไอศกรีมลดไขมันและพลังงานจากแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดง (Hylocereus costaricensis) ที่มีแอคติวิตีการต้านอนุมูลอิสระ
โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป

ส่วนที่ 2 แบบสอบถามเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ไอศกรีมลดไขมันและพลังงานจากแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดง (Hylocereus costaricensis) ที่มีแอคติวิตีการต้านอนุมูลอิสระ

**ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป**

**คำชี้แจง** กรุณาเติมเครื่องหมาย √ ลงในวงเล็บหน้าข้อความหรือเติมข้อความที่เป็นข้อมูลลงในช่องว่างโดยให้เลือกเพียงหนึ่งคำตอบ

1 . เพศ ( ) ชาย ( ) หญิง

2. อายุ ( ) ไม่เกิน 20 ปี ( ) 21 - 30 ปี ( ) 31 - 40 ปี ( ) 41 - 50 ปี ( ) มากกว่า 50 ปีขึ้นไป (โปรดระบุ)...........

3. สถานภาพสมรส ( ) โสด ( ) สมรส ( ) หย่า/ร้าง ( ) อื่นๆ (โปรดระบุ)...........

4. ปัจจุบันจำนวนสมาชิกที่พักอาศัยกับท่าน มีจำนวน.........................คน

5. อาชีพ

( ) นักเรียน/นักศึกษา ( ) รับราชการ ( ) รัฐวิสาหกิจ/พนักงานบริษัท
( ) ค้าขาย/ธุรกิจส่วนตัว ( ) รับจ้าง ( ) อื่น ๆ (ระบุ)....................

6. รายได้เฉลี่ยต่อเดือน

( ) ต่ำกว่า 5,000 บาท ( ) 5,001 - 10,000 บาท ( ) 10,001 - 15,000 บาท
( ) 15,001 - 20,000 บาท( ) 20,001 - 30,000 บาท( ) สูงกว่า 30,000 บาท

7. ระดับการศึกษา

( ) ประถมศึกษา ( ) มัธยมศึกษา ( ) อนุปริญญา/ปวส.
( ) ปริญญาตรี ( ) ปริญญาโทขึ้นไป ( ) อื่นๆ (โปรดระบุ).............

8. ความถี่ในการรับประทานอาหารประเภทไอศกรีม

( ) วันละ 1 ครั้ง ( ) มากกว่า 1 ครั้ง/สัปดาห์ (โปรดระบุ)..............
( ) มากกว่า 1 ครั้ง/เดือน (โปรดระบุ).......... ( ) อื่นๆ (โปรดระบุ)............

9. ในการเลือกรับประทานไอศกรีม ท่านคำนึงถึงเหตุผลใดมากที่สุด

( ) รสชาติ ( ) คุณค่าทางโภชนาการ ( ) หาซื้อง่าย ( ) ราคาถูก

( ) สีสัน ( ) กลิ่นหอม ( ) ความสะอาด ( ) อื่นๆ (โปรดระบุ).............

10. ถ้าท่านต้องการซื้อไอศกรีม ท่านคิดว่าควรเก็บรักษาไอศกรีม ได้.................. วัน

เพราะ..........................................................................................................................

11. ถ้ามีผลิตภัณฑ์ไอศกรีมลดไขมันและพลังงานจากแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดง (Hylocereus costaricensis) ที่มีแอคติวิตีการต้านอนุมูลอิสระ ท่านจะซื้อผลิตภัณฑ์นี้หรือไม่

( ) ซื้อ เพราะ.......................................................................

( ) ไม่แน่ใจ เพราะ.......................................................................

( ) ไม่ซื้อ เพราะ.......................................................................

12. ท่านคิดว่าราคาที่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ไอศกรีมในข้อที่ 11 ที่ท่านพอใจซื้อ เมื่อบรรจุในถ้วยขนาด 55 กรัม ควรอยู่ในราคาเท่าไร

( ) 10 บาท ( ) 15 บาท ( ) 20 บาท ( ) อื่นๆ (โปรดระบุ)..............

**ข้อเสนอแนะ**

..........................................................................................................................

..........................................................................................................................

..........................................................................................................................

ขอบคุณที่ให้ความร่วมมือ

นิสิตปริญญาโท ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยนเรศวร

**ใบรายงานผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบ**

Hedonic for Preference Test

**ผลิตภัณฑ์** ไอศกรีมลดไขมันและพลังงานจากแก้วมังกรเนื้อแดง **ครั้งที่**...........................

**ชื่อ สกุลผู้ทดสอบ**.........................................................**วันที่ทดสอบ**...............................

**เวลาทดสอบ**...............................

<u>คำแนะนำ</u>

กรุณาทดสอบตัวอย่างจากซ้ายไปขวาตามลำดับที่เสนอ และโปรดใส่คะแนนลงในช่องว่างที่กำหนดให้ ว่าท่านชอบหรือไม่ชอบไอศกรีมจากแก้วมังกรเนื้อแดงในระดับใด กรุณาบ้วนปาก

ทุกครั้งที่เปลี่ยนตัวอย่าง

การให้คะแนนให้ถือหลักเกณฑ์ต่อไปนี้

| | | | |
|---|---|---|---|
| ชอบมากที่สุด | 9 คะแนน | ไม่ชอบเล็กน้อย | 4 คะแนน |
| ชอบมาก | 8 คะแนน | ไม่ชอบปานกลาง | 3 คะแนน |
| ชอบปานกลาง | 7 คะแนน | ไม่ชอบมาก | 2 คะแนน |
| ชอบเล็กน้อย | 6 คะแนน | ไม่ชอบมากที่สุด | 1 คะแนน |
| ไม่รู้สึกว่าชอบหรือไม่ชอบ | 5 คะแนน | | |

| **รหัสตัวอย่าง** | .......................... | .......................... | ...................... |
|---|---|---|---|
| ความเรียบเนียน | .......................... | .......................... | ...................... |
| สี | .......................... | .......................... | ...................... |
| กลิ่นรส | .......................... | .......................... | ...................... |
| ความมัน | .......................... | .......................... | ...................... |
| ความเหนียวหนืด | .......................... | .......................... | ...................... |
| การละลายในปาก | .......................... | .......................... | ...................... |
| ความชอบรวม | .......................... | .......................... | ...................... |

**ข้อเสนอแนะ**

.....................................................................................................................................................

.....................................................................................................................................................

ภาคผนวก ง เอกสารรับรองโครงการวิจัยในมนุษย์

**เอกสารรับรองโครงการวิจัยในมนุษย์**
**คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร**

---

| | |
|---|---|
| ชื่อโครงการ | การพัฒนาไอศกรีมลดไขมันและพลังงานจากแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดง (*Hylocereus costaricensis*) ที่มีแอคติวิตีการต้านอนุมูลอิสระ Development of Reduced Fat and Calory Ice Cream from Red Dragon Fruit (*Hylocereus costaricensis*) with Antioxidant Activity |
| ชื่อหัวหน้าโครงการ | นางสาวขนิษฐา ตั้งสกุล |
| ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา | รศ.พันธ์ณรงค์ จันทร์แสงศรี |
| เลขที่โครงการ/รหัส | 50 02 02 0054 |
| สังกัดหน่วยงาน/คณะ | เกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม |
| การรับรอง | ขอรับรองโครงการวิจัยดังกล่าวข้างบนนี้ได้ผ่านการพิจารณาและรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ครั้งที่ 8/2550 เมื่อวันที่ 21 สิงหาคม 2550 |
| ประเภทการรับรอง | รับรองแบบเร่งรัด |

ลงนาม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิบูลย์ วัฒนาธร)
ประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์