

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี และวิธีการเตรียม

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth

Peptone	10	g.
Beef extract	10	g.
Yeast extract	5	g.
Glucose	20	g.
Dipotassium hydrogen phosphate	2	g.
Tween 80	1	g.
Diammonium hydrogen citrate	2	g.
Sodium acetate	5	g.
Magnesium sulfate	0.1	g.
Manganese sulfate	0.05	g.
น้ำกลั่น	1,000	ml.

วิธีการเตรียม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่ต้องการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ให้เติมวุ้นผงลงไป 20 กรัม

สารเคมีและวิธีการเตรียม

1. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลาย McFarland No. 1

เตรียมสารละลายดังนี้

A: ชั่งแบเรียมคลอไรด์ ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

B: ปิเปตกรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร ผสมสารละลาย A ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร กับสารละลาย B ปริมาตร 9.9 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข
ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์



ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

เรื่อง เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร

ฉบับที่ ๒

โดยที่เป็นการสมควรปรับปรุงเกี่ยวกับเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร เพื่อประโยชน์สาธารณะในการคุ้มครองผู้บริโภคและยกระดับกระบวนการผลิตอาหารให้ครอบคลุมและทันสมัยขึ้น ทั้งนี้ พิจารณาจากข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ภายในกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และเอกสารวิชาการหลายฉบับ

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๘ ณ แห่งพระราชบัญญัติระเบียบบริหารราชการแผ่นดิน พ.ศ. ๒๕๒๔ ซึ่งแก้ไขเพิ่มเติมโดยระเบียบบริหารราชการแผ่นดิน (ฉบับที่ ๔) พ.ศ. ๒๕๔๓ ประกอบกฎกระทรวงแบ่งส่วนราชการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. ๒๕๕๒ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จึงมีประกาศดังนี้

ข้อ ๑ ให้ยกเลิกประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ สธ 0524/5756 ลงวันที่ 24 สิงหาคม 2536 เรื่อง เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร

ข้อ ๒ ให้ใช้ เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร (ฉบับที่ ๒) ตามเอกสารแนบท้ายประกาศฯ นี้

ข้อ ๓ ประกาศฯ นี้ มีผลนับตั้งแต่วันที่ลงนามในประกาศฯ เป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ ๒๕ กันยายน พ.ศ. ๒๕๕๓

(นพ.จักรพรรณ ธรรมศักดิ์)
อธิบดี

เอกสารแนบท้ายประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
เรื่อง เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร
ฉบับที่ ๒

1. อาหารดิบ หมายถึงอาหารที่ยังบริโภคไม่ได้ ต้องผ่านการทำสุกหรือการเตรียมด้วยกรรมวิธีใด ๆ ก่อนบริโภค

1.1 เนื้อสดของสัตว์/สัตว์ปีก เช่น เนื้อหมู เนื้อไก่ เครื่องใน ไช้เข่านหรือไช้แจ๊ง

จำนวนจุลินทรีย์ / กรัม	น้อยกว่า 5×10^6
MPN <i>Escherichia coli</i> / กรัม	น้อยกว่า 100
<i>Staphylococcus aureus</i> / กรัม	น้อยกว่า 100
<i>Clostridium perfringens</i> / กรัม	น้อยกว่า 1,000
<i>Salmonella</i> spp. / 25 กรัม	ไม่พบ
<i>Campylobacter</i> ⁽¹⁾ / 25 กรัม	ไม่พบ

1.2 เนื้อสดของสัตว์น้ำแช่เย็นหรือแช่แข็ง

จำนวนจุลินทรีย์ / กรัม	น้อยกว่า 1×10^6
MPN <i>Escherichia coli</i> / กรัม	น้อยกว่า 3
<i>Staphylococcus aureus</i> / กรัม	น้อยกว่า 100
<i>Salmonella</i> spp. / 25 กรัม	ไม่พบ
<i>Vibrio cholerae</i> / 25 กรัม	ไม่พบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ⁽²⁾ / 25 กรัม	ไม่พบ
<i>Listeria monocytogenes</i> / 25 กรัม	ไม่พบ

1.3 เนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ ที่ผ่านกระบวนการทำให้แห้ง

ปริมาณน้ำอิสระในอาหาร (a_w)	น้อยกว่า 0.86
จำนวนยีสต์และรา / กรัม	น้อยกว่า 100
MPN <i>E.coli</i> / กรัม	น้อยกว่า 3
<i>Staphylococcus aureus</i> / กรัม	น้อยกว่า 100
<i>Salmonella</i> spp. / 25 กรัม	ไม่พบ

1.4 ไข่สด

<i>Salmonella</i> spp. / 25 กรัม	ไม่พบ
----------------------------------	-------

1.5 อาหารพร้อมปรุงหรืออาหารอื่น ๆ ที่มีอาหารดิบเป็นส่วนประกอบหรือส่วนผสม

จำนวนจุลินทรีย์ / กรัม	น้อยกว่า 1×10^6
MPN <i>Escherichia coli</i> / กรัม	น้อยกว่า 100
<i>Staphylococcus aureus</i> / กรัม	น้อยกว่า 100
<i>Clostridium perfringens</i> / กรัม	น้อยกว่า 1,000
<i>Bacillus cereus</i> / กรัม	น้อยกว่า 1,000
<i>Salmonella</i> spp. / 25 กรัม	ไม่พบ
<i>Vibrio cholera</i> / 25 กรัม	ไม่พบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ⁽²⁾ / 25 กรัม	ไม่พบ

2. อาหารพร้อมบริโภค

2.1 อาหารดิบที่เตรียมหรือปรุงในสภาพบริโภคได้ทันที

2.1.1 ผัก ผลไม้ สลัด ส้มตำ

จำนวนจุลินทรีย์ / กรัม	น้อยกว่า 1×10^6
จำนวนรา / กรัม	น้อยกว่า 500
จำนวนยีสต์ ⁽³⁾ / กรัม	น้อยกว่า 1×10^4
MPN <i>Escherichia coli</i> / กรัม	น้อยกว่า 100
<i>Staphylococcus aureus</i> / กรัม	น้อยกว่า 100
<i>Salmonella</i> spp. / 25 กรัม	ไม่พบ
<i>Listeria monocytogenes</i> ⁽⁴⁾ / 25 กรัม	ไม่พบ

2.1.2 อาหารทะเล เช่น ปลา กุ้ง ปลาหมึก หอย ซาซิมิ

จำนวนจุลินทรีย์ / กรัม	น้อยกว่า 1×10^5
MPN <i>Escherichia coli</i> / กรัม	น้อยกว่า 3
<i>Staphylococcus aureus</i> / กรัม	น้อยกว่า 100
<i>Salmonella</i> spp. / 25 กรัม	ไม่พบ
<i>Vibrio cholerae</i> / 25 กรัม	ไม่พบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> / 25 กรัม	ไม่พบ
<i>Listeria monocytogenes</i> / 25 กรัม	ไม่พบ

2.2 อาหารปรุงสุกหรืออาหารที่ผ่านกรรมวิธีเก็บรักษา

2.2.1 ขนมหวาน ผัก ผลไม้ (คอง แฉล้ม เชื่อม กวน แห้ง)

จำนวนยีสต์และรา / กรัม	น้อยกว่า 1,000
MPN <i>Escherichia coli</i> / กรัม	น้อยกว่า 3
<i>Staphylococcus aureus</i> / กรัม	น้อยกว่า 100
<i>Salmonella</i> spp. / 25 กรัม	ไม่พบ

2.2.2 ขนมีปิ้งมีไส้หรือไม่มีไส้ อาจผสมวัตถุดิบที่ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ เช่น ลูกพรุน ลูกเกด ช็อกโกแลต

จำนวนจุลินทรีย์ / กรัม	น้อยกว่า 1×10^4
จำนวนยีสต์และรา / กรัม	น้อยกว่า 100
MPN <i>Escherichia coli</i> / กรัม	น้อยกว่า 3
<i>Staphylococcus aureus</i> / กรัม	น้อยกว่า 10
<i>Salmonella</i> spp. / 25 กรัม	ไม่พบ

2.2.3 อาหารหมักพื้นเมืองที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น แหนม กะปิ ปลา ร้า ปลาจ่อม ส้มพิก บูด

MPN <i>Escherichia coli</i> / กรัม	น้อยกว่า 3
<i>Staphylococcus aureus</i> / กรัม	น้อยกว่า 100
<i>Clostridium perfringens</i> / กรัม	น้อยกว่า 1,000
<i>Bacillus cereus</i> / กรัม	น้อยกว่า 1,000
<i>Salmonella</i> spp. / 25 กรัม	ไม่พบ

2.2.4 อาหารปรุงสุกทั่วไป เช่น อาหารปรุงสำเร็จ (ประเภทข้าวแกง ก๋วยเตี๋ยว ขนมจีน) ข้า ไส้กรอก หมูขบ ปูด ปลาหมึกปรุงรส ชูชิ

จำนวนจุลินทรีย์ / กรัม	น้อยกว่า 1×10^6
MPN <i>Escherichia coli</i> / กรัม	น้อยกว่า 3
<i>Staphylococcus aureus</i> / กรัม	น้อยกว่า 100
<i>Clostridium perfringens</i> / กรัม	น้อยกว่า 100
<i>Bacillus cereus</i> / กรัม	น้อยกว่า 100
<i>Salmonella</i> spp. / 25 กรัม	ไม่พบ
<i>Vibrio cholerae</i> / 25 กรัม	ไม่พบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ⁽²⁾ / 25 กรัม	ไม่พบ
<i>Listeria monocytogenes</i> / 25 กรัม	ไม่พบ

2.2.5 อาหารที่ผ่านกระบวนการทำให้แห้ง อบหรือทอด เช่น อาหารอบกรอบ อาหารทอดกรอบ น้ำพริก

ปริมาณน้ำอิสระในอาหาร (a_w)	น้อยกว่า 0.86
จำนวนยีสต์และรา / กรัม	น้อยกว่า 100
MPN <i>Escherichia coli</i> / กรัม	น้อยกว่า 3
<i>Staphylococcus aureus</i> / กรัม	น้อยกว่า 10
<i>Clostridium perfringens</i> / กรัม	น้อยกว่า 100
<i>Bacillus cereus</i> / กรัม	น้อยกว่า 1,000
<i>Salmonella</i> spp. / 25 กรัม	ไม่พบ

3. น้ำดื่มที่ไม่บรรจุในภาชนะปิดสนิท เช่น น้ำผ่านเครื่องกรอง

<i>Escherichia coli</i> / 100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
<i>Staphylococcus aureus</i> / 100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
<i>Salmonella</i> spp. / 100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
<i>Clostridium perfringens</i> / 100 มิลลิลิตร	ไม่พบ

4. เครื่องดื่มที่ไม่บรรจุในภาชนะปิดสนิท เช่น เครื่องดื่มมรดเย็น / แผลงลอยริมถนน / ร้านอาหารฯ

จำนวนยีสต์ / มิลลิลิตร	น้อยกว่า 5,000
จำนวนเชื้อรา / มิลลิลิตร	น้อยกว่า 100
<i>Escherichia coli</i> / มิลลิลิตร	ไม่พบ
<i>Staphylococcus aureus</i> / 0.1 มิลลิลิตร	ไม่พบ
<i>Salmonella</i> spp. / 25 มิลลิลิตร	ไม่พบ
<i>Clostridium perfringens</i> / มิลลิลิตร	น้อยกว่า 100
<i>Bacillus cereus</i> / มิลลิลิตร	น้อยกว่า 100

5. ภาชนะสัมผัสอาหาร ⁽⁵⁾

จำนวนจุลินทรีย์ / ชิ้นภาชนะ	น้อยกว่า 1,000
<i>Staphylococcus aureus</i> / ชิ้นภาชนะ	ไม่พบ
<i>Salmonella</i> spp. / ชิ้นภาชนะ	ไม่พบ

6. พื้นผิวสัมผัสอาหาร

<i>Escherichia coli</i> / 50 ตารางเซนติเมตร	ไม่พบ
<i>Staphylococcus aureus</i> / 50 ตารางเซนติเมตร	ไม่พบ
<i>Salmonella</i> spp. / 50 ตารางเซนติเมตร	ไม่พบ
<i>Clostridium perfringens</i> / 50 ตารางเซนติเมตร	ไม่พบ
<i>Bacillus cereus</i> / 50 ตารางเซนติเมตร	ไม่พบ

7. มือผู้สัมผัสอาหาร ⁽⁶⁾

<i>Escherichia coli</i> / มือ	ไม่พบ
<i>Staphylococcus aureus</i> / มือ	ไม่พบ
<i>Salmonella</i> spp. / มือ	ไม่พบ

หมายเหตุ

- (1) *Campylobacter jejuni / coli*
- (2) เฉพาะอาหารทะเลหรืออาหารที่มีอาหารทะเลเป็นองค์ประกอบ
- (3) เฉพาะผลไม้หรือมีผลไม้เป็นส่วนประกอบ
- (4) เฉพาะผักหรือมีผักเป็นองค์ประกอบ
- (5) สุ่มตัวอย่างชนิดเดียวกันอย่างน้อย 4 ชั้นภาชนะ
ยกเว้น เชียง/ มีด/ ครก/ ภาชนะที่มีขนาดใหญ่ สุ่มตัวอย่าง 1 ชั้น
- (6) swab มือข้างที่ถนัด 1 มือ

กรณีที่ตรวจพบ *Staphylococcus aureus* หรือ *Clostridium perfringens* หรือ *Bacillus cereus* ต่อกรัมหรือมิลลิลิตร น้อยกว่า 10 น้อยกว่า 100 หรือน้อยกว่า 1,000 ให้หมายถึงตรวจไม่พบเชื้อเหล่านั้นใน 0.1, 0.01 หรือ 0.001 กรัม หรือมิลลิลิตร ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

1. กรมประมง 2009. มาตรฐานผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทางจุลชีววิทยา. Rev. 4, 2009.
2. กรมปศุสัตว์ ๒๕๕๑. เกณฑ์ด้านจุลชีววิทยาของสินค้าปศุสัตว์เพื่อการส่งออก. ลงวันที่ ๓๐ ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๕๑
3. ปรีชา จิงสมานกุล และคณะ. การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผักสด. ว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2553; 52 (1-2): 16-25.
4. พระราชบัญญัติอาหาร 2522. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องมาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 126 ตอนพิเศษ 41 ง (วันที่ 19 มีนาคม 2552)
5. สถาบันอาหาร 2552. กฎระเบียบและมาตรฐานอาหารต่างประเทศ (ญี่ปุ่น) ใน: หลักเกณฑ์ด้านจุลินทรีย์ในอาหาร Rev. 0, 2552.
6. Codex Alimentarius. CAC/GL 61-2007. Guideline on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in foods; 2007.
7. Commission Regulation (EC) No.2073. Microbiological criteria for foodstuffs, 2005.
8. Downes, P.W. and Keith, I. (eds.), 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. American Public Health Association (APHA). Washington, DC.
9. Food Standards Australia - New Zealand: User guide standard 1.6.1 – Microbiological limits for food with additional guideline criteria, 2001.
<http://www.foodstandards.gov.au/foodstandards/userguides/microbiologicallimit1410.cfm>

10. Ingram, M., Bray F.D., Clark, S.D., Dolman, E.C., Elliott, P.R. and Thatcher, S.F. (eds) 1974.
Microorganisms in foods, sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications.
University of Toronto Press. Toronto.
11. International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF). Microbial ecology of foods
Volume 2: Food Commodities. Academic Press Inc; 1980.
12. ISO 18593: 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal methods for sampling
techniques from surfaces using contact plates and swabs.
13. Microbiological reference criteria for food 1995. <http://www.nzfsa.govt.nz>.
14. Ohashi, M., Marakami, H., Kudoh, Y. and Sakai, S. 1978. Manual for the laboratory diagnosis of bacterial
food poisoning and the assessment of the sanitary quality of food, Seamic Publication No.,12, Tokyo.
15. World Health Organization (WHO), 2008. Guidelines for drinking-water quality.
Third edition, Volume 1: Recommendations.
[http:// www.who.int/water_sanitation_health/dwq/secondaddendum20081119.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/secondaddendum20081119.pdf)

ภาคผนวก ค
วิธีการวิเคราะห์คุณภาพ

วิธีการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

1. การวิเคราะห์ความชื้น (AOAC, 2005)

อุปกรณ์

1. ภาชนะอะลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น
2. ตู้อบไฟฟ้า
3. โถดูดความชื้น
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการวิเคราะห์

1. อบอุ่นภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้นหลังจากนั้นชั่งน้ำหนัก
2. ทำเช่นเดียวกับข้อ 1 ชั่งจนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนอย่างละเอียดประมาณ 1-2 กรัม ใส่ในภาชนะหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว
4. นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่วโมง
5. นำออกจากตู้อบใส่โถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งหาน้ำหนัก
6. อบซ้ำอีกครั้งประมาณ 30 นาทีและทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

7. คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้นคิดเป็นเปอร์เซ็นต์} = \frac{M1 - M2}{M1} \times 100$$

เมื่อ M1 คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

M2 คือ น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

2. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (AOAC, 2005)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์การย่อยโปรตีน ประกอบด้วยเตาเผาและเครื่องดักจับไอกรด
2. อุปกรณ์กลั่นโปรตีน
3. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร และขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
4. ปิเปต (แบบกระเปราะ) ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
5. บิวเรตขนาด 25 มิลลิลิตร
6. ลูกแก้ว

7. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

สารเคมี

1. สารผสมระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) และโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4)

อัตราส่วน 1:10

2. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40
4. กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4
5. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N
6. อินดิเคเตอร์เป็นสารผสมระหว่างเมทิลเรด เมธิลีนบลู และโบรโมครีซอลกรีน

วิธีการวิเคราะห์

ขั้นตอนการย่อย

1. การชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน 1-3 กรัมใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีน
2. ใส่สารผสมระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟตและโพแทสเซียมซัลเฟต ปริมาณ 5 กรัม
3. เติมกรดซัลฟูริกปริมาณ 20 มิลลิลิตร
4. วางหลอดย่อยในตัวอย่างย่อยแล้วประกอบสายยางระหว่างฝาครอบ ขวดใส่ต่างและเครื่อง

ดักจับไอกรดให้เรียบร้อย

5. เปิดสวิตช์เครื่องดักจับไอกรดและเตาย่อยแล้วตั้งอุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีจากนั้นปรับเพิ่มอุณหภูมิเป็น 400 องศาเซลเซียส ย่อยต่ออีก 60 นาที จนได้สารละลายใส

6. ปลอยทิ้งไว้ให้เย็น

ขั้นตอนการกลั่นและไตเตรท

1. จัดอุปกรณ์กลั่น แล้วเปิดสวิตช์ให้ความร้อน และเปิดน้ำหล่อเย็นเครื่องควบแน่น
2. นำขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุกรดบอริก (เข้มข้นร้อยละ 4) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติมอินดิเคเตอร์แล้วไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้ โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลายกรด

3. เติมน้ำกลั่นลงในหลอดย่อย 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ทำปฏิกิริยาเกินพอสังเกตให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลขุ่น

4. กลั่นให้ได้ของเหลวอยู่ในระดับ 125 มิลลิลิตร

5. ไตเตรทสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 0.1 N จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วง

6. คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากสูตร

$$\text{ปริมาณโปรตีน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(A-B) \times N \times 1.4007}{W} F$$

เมื่อ A คือปริมาณกรดที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B คือปริมาณกรดที่ใช้ไตเตรทกับแบลงค์ (มิลลิลิตร)

N คือความเข้มข้นของกรด (N)

F คือแฟคเตอร์ (5.85)

W คือน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

3. การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (AOAC, 2005)

อุปกรณ์

1. Soxhlet apparatus
2. หลอดใส่ตัวอย่าง
3. สำลี
4. ตู้อบไฟฟ้า
5. เครื่องชั่งไฟฟ้า
6. โถดูดความชื้น

สารเคมี

ปิโตรเลียมอีเทอร์หรือเฮกเซน

วิธีการวิเคราะห์

1. ใส่ขวดกลสำหรับการหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้า ที่ตั้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก 3-5 กรัม ห่อให้มิดชิดใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง
3. นำหลอดตัวอย่างใส่ลงใน Soxhlet เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียม อีเทอร์ ลงในขวดหาไขมันประมาณ 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตา
4. ประกอบอุปกรณ์ชุดกลั่นไขมัน พร้อมทั้งเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่นและเปิดสวิทช์ให้ความร้อน
5. ปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 150 หยดต่อนาที
6. เมื่อครบ 6 ชั่วโมงแล้ว นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจาก Soxhlet ตั้งให้ตัวทำละลายไหลจาก Soxhlet ลงในขวดก้นกลมจนหมด
7. ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ
8. นำขวดหาไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสจนแห้ง ตั้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
9. ชั่งน้ำหนัก แล้วอบซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
10. คำนวณหาปริมาณไขมันจากสูตร

$$\text{ปริมาณไขมัน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{W2 \times 100}{W1}$$

เมื่อ W1 คือ น้ำหนักขวดตัวอย่างก่อนอบ

W2 คือ น้ำหนักขวดตัวอย่างหลังอบ

4. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC, 2005)

อุปกรณ์

1. Crucible
2. Muffle furnace (เตาเผา)
3. Hot plate
4. โถดูดความชื้น
5. เครื่องชั่ง

วิธีการวิเคราะห์

1. เพลถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง นำออกจากเตาเผาเก็บไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก บันทึกผล

2. ทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 1. จนกระทั่งได้น้ำหนักที่คงที่(ในแต่ละซ้ำต่างกันไม่เกิน 3 มิลลิกรัม) หาค่าเฉลี่ย บันทึกผล (W1)

3. ชั่งตัวอย่างอย่างละเอียดประมาณ 2 กรัม (S) ลงในถ้วยกระเบื้องเคลือบ เฝานบนเตาไฟฟ้า จนหมดควัน

4. นำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้เถ้าสีเทาอ่อน หรือสีขาวสม่ำเสมอ นำออกจากเตาเผา เก็บในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก บันทึกผล

5. ทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 4. (ในแต่ละซ้ำต่างกันไม่เกิน 3 มิลลิกรัม) หาค่าเฉลี่ย บันทึกผล (W2)

6. คำนวณหาปริมาณเถ้าจากสูตร

$$\text{ปริมาณเถ้า (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(M2 - M1) \times 100}{S}$$

5. การวิเคราะห์หาปริมาณใยอาหารโดยใช้วิธีการสกัดด้วยกรด-ด่าง (AOAC, 2005)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ชุดหาปริมาณใยอาหาร
2. กระดาษกรองเบอร์ 41
3. Suction funnel
4. กรวยกรอง

5. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ

6. Hot air oven

7. เตาอบ

8. โถดูดความชื้น

9. เครื่องชั่ง

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 1.25

2. โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 1.25

3. เอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95

วิธีการวิเคราะห์

1. นำกระดาษกรองอบในตู้อบ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงแล้วนำมาใส่ในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนัก

2. ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการสกัดไขมันออกและนำมาใส่ในบีกเกอร์สำหรับวิเคราะห์ใยอาหาร

3. เติมกรดซัลฟิวริก ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

4. วางบีกเกอร์ลงบนอุปกรณ์ให้ความร้อนที่ต่อกับเครื่องควบแน่นและเปิดน้ำหล่อเครื่องควบแน่นเปิดสวิตช์ไฟฟ้า ต้มให้เดือดนาน 30 นาที

5. กรองตัวอย่างขณะร้อนผ่านกระดาษกรองล้างด้วยน้ำร้อนจนกระทั่งน้ำล้างหมดความเป็นกรด

6. ถ่ายกากที่ได้ในบีกเกอร์ไปเติมเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณ 200 มิลลิลิตร

7. วางบีกเกอร์ลงบนอุปกรณ์ให้ความร้อนที่ต่อกับเครื่องควบแน่นและเปิดน้ำหล่อเครื่องควบแน่นเปิดสวิตช์ไฟฟ้า ต้มให้เดือดนาน 30 นาที

8. กรองขณะร้อนผ่านกระดาษกรองแผ่นเดิมล้างด้วยน้ำร้อนจนกระทั่งน้ำล้างหมดความเป็นด่าง

9. ล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ปริมาณ 10 มิลลิลิตร

10. นำกระดาษกรองพร้อมกากใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบและอบในตู้อบ 105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่ในโถดูดความชื้น

11. ชั่งน้ำหนักซ้ำจนกระทั่งได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

12. คำนวณหาปริมาณเถ้าตามสูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณใยอาหาร} = \frac{(M2 - M1) \times 100}{S}$$

S

เมื่อ M1 คือน้ำหนักตัวอย่างหลังเผา

M2 คือผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

S คือน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น

6. การวัดปริมาณกรดทั้งหมด (AOAC, 2005)

อุปกรณ์

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter ; Santorinous : PB-10)

สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide; NaOH) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ซึ่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นต้มที่ทิ้งไว้ให้เย็นแล้ว ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรนำไปหาความเข้มข้นที่แน่นอนด้วยโพแทสเซียมไฮโดรเจนแทลเลต ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

2. สารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนธาเลต (Potassium Hydrogen Phthalate; $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$) ความเข้มข้น 0.1 M นำ $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ ประมาณ 5 g อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมงทิ้งให้เย็นใน Desecrator ซึ่ง $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1.6338 g ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง เติมน้ำกลั่นประมาณ 50 ml คนให้ละลายเทใส่ขวดปริมาตรขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

การคำนวณหาความเข้มข้นของ $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$

มวลโมเลกุลของ $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ คือ 204.22

$$\begin{aligned}\text{ความเข้มข้นของ } \text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4 &= (1.6338 \times 1000) / (204.22 \times 100) \\ &= 0.0800 \text{ N}\end{aligned}$$

3. ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthaline; $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$) ความเข้มข้น 1%

ซึ่งฟีนอล์ฟทาลีน 1 กรัม ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง เติเมทานอล 95% ลงไปจำนวน 60 มิลลิลิตร คนให้สารละลาย ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

7. การวัดค่ากัมมันตภาพน้ำ (a_w) ด้วยเครื่องวัด Water Activity Meter (AOAC, 2005)

อุปกรณ์

1. ตลับพลาสติก (aw box)

2. เครื่องวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพน้ำ (Water Activity Meter ; Aqualab, CX3TE, USA)

วิธีการวัด

เปิดเครื่องและอุ่นเครื่องประมาณ 30 นาที ก่อนทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง บรรจุตัวอย่างลงในตลับพลาสติก (aw box) ที่สะอาด โดยไม่เกินครึ่งของตลับพลาสติก (aw box) ดึงลิ้นชักของเครื่องออกจากตัวเครื่องจากตำแหน่ง open/load และทำการใส่ตลับพลาสติก (aw box) ลงไป ดึงลิ้นชักเข้าไปในตัวเครื่องกลับเข้าตำแหน่งเดิมหมุนปุ่มของลิ้นชักจากตำแหน่ง open/load ไปยังตำแหน่ง read เครื่องจะเริ่มทำการวิเคราะห์ เมื่อเครื่องทำการวิเคราะห์เรียบร้อยแล้ว จะมีสัญญาณเตือนดังถึ และมีไฟสีเหลืองกระพริบขึ้นอ่านผลตัวเลขที่หน้าจอ บันทึกค่า ทำการวัด 3 ครั้ง นำมาหาค่าเฉลี่ย

8. การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (AOAC, 2005)

อุปกรณ์

เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter ; Santorious : BP-10, Germany)

วิธีการปรับมาตรฐาน

ปรับมาตรฐานของเครื่องวัดความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายมาตรฐานที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.00 และ 4.01 ตามลำดับ

วิธีการวัด

ชั่งตัวอย่างจำนวน 20 กรัม เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตรแล้วจึงนำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่มีการปรับมาตรฐานแล้ว นำหัวอิเล็กโทรดจุ่มลงในสารละลายที่วัด รอจนกว่าค่าที่อ่านได้จากเครื่องจะหยุดนิ่ง แล้วจึงบันทึกผลค่าที่วัดได้

9. การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total Soluble Solids, ° Brix) โดยใช้ Hand refractometer (AOAC, 2005)

วิธีวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างสารสกัดบีทรูทเข้มข้นมาวัดด้วยเครื่องวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (Hand refractometer) ปรับเทียบมาตรฐานโดยใช้น้ำกลั่นปรับให้อ่านได้ 0 ก่อนการใช้วัดตัวอย่างทุกครั้ง ค่าที่อ่านได้มีหน่วยเป็นองศาบริกซ์ ซึ่งแต่ละตัวอย่างจะทำการวัด 3 ซ้ำ

2. เมื่ออ่านค่าเสร็จควรล้างและเช็ดเครื่องวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (Hand refractometer) ให้สะอาด

วิธีการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา

1. การวิเคราะห์คุณภาพ *Salmonella* spp. (ISO 6579, 2002)

อุปกรณ์

- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
- Water bath
- ตู้อบฆ่าเชื้อ
- ตู้บ่มเชื้อ
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
- เครื่องตีตัวอย่าง
- จานเลี้ยงเชื้อ
- ปิเปต
- ตะเกียงแก๊ส
- แอลกอฮอล์ (70% v/v)
- ห่วงเขี่ยเชื้อ
- เข็มเขี่ยเชื้อ
- นาฬิกาจับเวลา
- กระดาษวัด pH

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารทดสอบ

- Lactose broth (LB)
- Tetrathionate broth ผสม brilliant green และ iodine (TT) บรรจุใน หลอด

ๆ ละ 10 ml.

- Rappaport – Vassiliadis broth (RV) บรรจุในหลอด ๆ ละ 10 ml
- Bismuth Sulfite Agar (BS) เตรียมก่อนใช้ 1 วันและเก็บในที่มืด
- Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD)
- Hektoen enteric agar (HE)
- Mac Conkey agar (Mac)
- Triple Sugar iron agar (TSI)
- Lysine iron agar (LIA)
- Urea broth (UB)
- Iodine solution (สำหรับ Tetrathionate broth)
- 1 % Brilliant green dye solution R8 (สำหรับ Tetrathionate broth)
- 0.85 % NaCl solution
- API

วิธีการทดสอบ

1. Pre-enrichment

- ชั่งตัวอย่าง 125 ± 0.1 กรัม ใส่ในถุง stomacher เติม Lactose Broth 1,125 ml ตีให้ตัวอย่างกระจายทั่วสารละลายด้วยเครื่องตีตัวอย่าง เป็นเวลา 2 นาที มัดปากถุงหลวม ๆ แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 ± 5 นาที เขย่าถุงเบาๆ ให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน แล้ววัดค่า pH ให้อยู่ในช่วง 6.8 ± 0.2 หากค่า pH ไม่อยู่ในช่วงที่กำหนดให้ปรับด้วย กรดหรือด่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปบ่มต่อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 35 ± 2 °C เป็นเวลา 24 ± 2 ชม.

- กรณีตัวอย่างที่อยู่ในสภาพแช่แข็ง ไม่ควรปล่อยให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง ถ้าจำเป็นให้ละลายได้ที่ 45 ± 0.2 °C แต่ต้องไม่เกิน 15 นาที หรือให้ละลายที่ $2-5$ °C เป็นเวลา 18 ชม.

2. Selective Enrichment

- นำถุงตัวอย่างที่บ่มครบตามเวลาที่กำหนดเขย่าถุงเบาๆ ก่อนปิเปตตัวอย่างมา 1 ml ถ่ายเชื้อลงใน TT 10 ml นำไปบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 43 ± 0.2 °C สำหรับตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของเชื้อสูง เช่น ของสด อาหารพร้อมปรุง อาหารรับประทานดิบ และที่อุณหภูมิ 35 ± 2 °C เป็นเวลา 24 ± 2 ชม. สำหรับตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนทางเชื่อน้อย เช่น ของแห้ง อาหารพร้อมบริโภค และตุ๋นมา 0.1 ml ถ่ายเชื้อลงใน RV 10 ml นำไปบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 42 ± 0.2 °C เป็นเวลา 24 ± 2 ชม.

3. Selective plating

- เมื่อบ่มครบตามกำหนดแล้ว ให้เขย่าเชื้อก่อนจะ streak เชื้อจากหลอด TT และ RV ลงบนเพลทของอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ HE, BS และ XLD (BS ต้องเตรียมก่อนการ streak 1 วัน โดยเก็บไว้ในที่มีดที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะ streak) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 35 ± 2 °C พลิกให้เพลทด้านที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ด้านบน บ่มนาน 24 ± 2 ชม. ในกรณีที่ไม่มีเชื้อขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ BS ให้บ่มต่อไปจนครบ 48 ชม.

- ลักษณะ Typical colony ของ *Salmonella* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมีดังนี้

1. HE : โคโลนีกลม สีเขียวน้ำเงิน จนถึงสีน้ำเงิน อาจมีหรือไม่มีจุดดำตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ ยังคงมีสีเขียว แต่อาจพบโคโลนีขนาดใหญ่ที่มีจุดดำแวววาวตรงกลางหรืออาจดำทั้งโคโลนี

2. XLD : โคโลนีกลม สีชมพูใส อาจมีหรือไม่มีจุดดำตรงกลาง อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีชมพู แต่อาจพบโคโลนีขนาดใหญ่ที่มีจุดดำแวววาวตรงกลางหรืออาจดำทั้งโคโลนี

3. BS : โคโลนีกลม สีน้ำตาล , เทาหรือดำ อาจมี metallic sheen หรือไม่ก็ได้ อาหารเลี้ยงเชื้อ รอบ ๆ โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในช่วงแรกและเปลี่ยนเป็นสีดำเมื่อบ่มนานขึ้น และอาจจะมีลักษณะบวมตรงกลางที่เรียกว่า halo effect

- เมื่อบ่มครบ 24 ชม. หากมีเชื้อที่ให้ลักษณะ typical colony บน HE หรือ XLD ให้ทำการเลือกมา 2 โคโลนีหรือมากกว่า กรณีที่ไม่มี typical ให้เลือก atypical colony มา 2 โคโลนีหรือมากกว่า จากอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมาทดสอบทาง biochem ต่อไป ส่วน BS เมื่อบ่มครบ 24 ชม. ถ้ายังไม่ได้ลักษณะของ typical colony ให้บ่มเชื้อต่อไปอีก 24 ชั่วโมงก่อนเลือก typical colony โดยเลือกมาจำนวน 2 โคโลนีหรือมากกว่า กรณีที่ไม่มี typical ให้เลือก atypical colony มา 2 โคโลนีหรือมากกว่า นำมาทดสอบทาง biochem ต่อไป

- ลักษณะ atypical colony ของ *Salmonella* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมี ดังนี้

1. HE และ XLD : โคโลนีกลม สีเหลือง อาจมีหรือไม่มีจุดดำตรงกลาง โคโลนี

2. BS : โคโลนีกลม สีเขียว อาหารเลี้ยงเชื้อรอบ ๆ โคโลนีอาจเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือไม่เปลี่ยนก็ได้

4. Biochemical Screening

นำเชื้อที่ให้ลักษณะ typical colony หรือลักษณะ atypical colony ตามต้องการ มาทดสอบคุณสมบัติทาง biochem โดยเชื้อจากจุดตรงกลางโคโลนีเดียวกันและจะต้องเชื้อเชื้อเพียงครั้งเดียวแล้วถ่ายลงอาหารทดสอบให้ครบชุด

4.1 การทดสอบการใช้น้ำตาลใน TSI

ใช้ needle ถ่ายเชื้อลงใน TSI โดย streak บน slant และแทงลงในส่วนของ butt ในลักษณะแนวตั้งตรง ปิดฝาหลวมๆ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ± 2 ชม. เชื้อ typical colony ของ *Salmonella* spp. สามารถใช้ glucose ได้เพียงอย่างเดียวจึงให้ผลใน TSI เป็น K/A มีแก๊ส และอาจจะสร้างหรือไม่สร้าง H_2S

4.2 การทดสอบในอาหาร LIA

ใช้ needle ที่ถ่ายเชื้อลงใน TSI แล้วมาถ่ายเชื้อต่อลงใน LIA โดย แทงลงในส่วนของ butt ในลักษณะแนวตั้งตรง 2 ครั้ง ความลึกประมาณ 4 cm จากนั้นนำมา streak บน slant และ ปิดฝาหลวมๆ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ± 2 ชม. อ่านผล เชื้อ typical colony ของ *Salmonella* spp. สามารถสร้างเอ็นไซม์ lysine decarboxylase ได้ จึงให้ผลใน LIA เป็น K/K แต่อาจมีหรือไม่มีแก๊ส และสร้าง H_2S ในกรณีที่สีของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่แสดงสีอะไรเลยอย่าทิ้ง ให้ทำการทดสอบต่อไป

หลักการพิจารณาผลจาก TSI และ LIA

- ถ้า LIA ให้ผลเป็น K/K purple ให้นำไปทดสอบต่อได้เลย (โดยไม่ต้องคำนึงถึงผลของ TSI)

- ถ้าใน LIA ให้ผลเป็น K/A แต่ใน TSI ให้ผลเป็น K/A ก็ให้นำไปทดสอบต่อได้เลย

- ถ้าใน LIA ให้ผลเป็น K/A แต่ใน TSI ให้ผลเป็น A/A แสดงว่าไม่ใช่เชื้อ *Salmonella* spp. ให้ทิ้งได้เลย

5. การแยกเชื้อ *Salmonella*

5.1 การแยกเชื้อโดยใช้ Mac Conkey agar

- ใช้ needle เขี่ยเชื้อที่ทดสอบคุณสมบัติทาง biochem จาก TSI ว่ามีลักษณะของเชื้อ *Salmonella* spp มาทดสอบบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mac Conkey agar 1 เส้น จากนั้นใช้ loop streak เชื้อบนผิวหน้าอาหารที่ใช้ needle ขีดไว้ แล้วนำไปบ่มที่ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 24 ± 2 ชม อ่านผล

- ลักษณะโคโลนี Mac Conkey agar จะมีลักษณะของโคโลนีใสไม่มีสี สามารถมองเห็นทะลุผ่านได้ แต่บางครั้งอาจมีจุดสีดำตรงกลาง ถ้าพบว่ามีโคโลนีลักษณะอื่นด้วยให้เลือกโคโลนีลักษณะกลมใสไม่มีสีมาทดสอบใหม่ตั้งแต่ขั้นตอนการ streak ลงบน HE, BS, XLD และการทดสอบเชื้อลงใน TSI และ LIA

5.2 การแยกเชื้อโดยใช้ Urease test

- ใช้ needle เขี่ยเชื้อบน TSI slant ซึ่งได้ผลการสันนิษฐานว่าน่าจะเป็นเชื้อ *Salmonella* spp. ลงใน urea broth จากนั้นบ่มที่ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ± 2 ชม ในขั้นตอนนี้ให้ทำ negative และ positive control ควบคู่ไปด้วย

- เชื้อ *Salmonella* spp. จะให้ผลลบด้วยวิธีนี้คือ อาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่เปลี่ยนสี ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดงให้ทิ้งได้เลย

- ในกรณีที่เชื้อให้ผลเป็นลบด้วยวิธี urease test ให้นำเชื้อมาทดสอบทางชีวเคมีด้วย API 20E diagnostic strips and reagents (Bio Merieux Vitek, Inc.) โดยดำเนินการตามขั้นตอนที่บริษัทผู้ผลิตเป็นผู้กำหนด

6. การรายงานผล

รายงานพบหรือไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างอาหาร 125 กรัม

2. การวิเคราะห์คุณภาพ *Escherichia coli* (BAM, 2001)

อุปกรณ์

- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- ตู้บ่มฆ่าความร้อนแห้ง
- ตู้บ่มเชื้อ
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
- เครื่องตีตัวอย่าง
- จานเพาะเชื้อ

- ปีเปต
- ตะเกียงแก๊ส
- แอลกอฮอล์ (70% v/v)
- ห่วงเขี่ยเชื้อ
- ปากคืบ
- ตะแกรงวางหลอดทดลอง (Rack)
- หลอดทดลอง
- หลอดดักแก๊ส (Durham tube)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารทดสอบ

- Butter field's phosphate-buffered water
- Phosphate buffered dilution water
- Lauryl Tryptose Broth (Single Strength)
- Lauryl Tryptose Broth (Triple Strength)
- EC broth
- Levine's Eosin-Methylene Blue (L-EMB) agar
- Tryptone (Tryptophane) broth
- MR-VP medium
- Kovac's reagent
- Voges Proskauer (α -naphthol solution 5%)
- Methyl red indicator
- VRBA (Violet red bile agar)
- Koser's citrate broth
- Nutrient agar slant
- Mineral-modified glutamate medium (MMG)
- Tryptone bile glucuronide agar (TBX)

ขั้นตอนและวิธีการทดสอบ

- การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง 50.0 ± 0.1 กรัม ลงในถุงปั่นตัวอย่าง จากนั้นเติม 450 มิลลิลิตร ของ Butter field's phosphate-buffered water ปั่นตัวอย่างนาน 2 นาที แล้วนำมาเจือจาง เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการหมายเหตุ สำหรับอาหารแช่แข็ง ก่อนชั่งน้ำหนักตัวอย่างต้องทำให้ อาหารละลายในตู้เย็นอุณหภูมิ $2 - 5^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลาไม่เกิน 18 ชั่วโมง ไม่ควรปล่อยให้ละลายที่ อุณหภูมิห้อง

- วิธีทดสอบ *Escherichia coli* โดยวิธี Most Probable Number (MPN Method)

เจือจางตัวอย่างให้มีระดับความเจือจาง 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} จากนั้นให้ทำ 3-tube MPN โดยใช้ series 3:3:3

1. MPN - Presumptive test for *Escherichia coli*

ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ในแต่ละระดับความเจือจางของ 3 tube MPN อย่างละ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ LST ที่มีหลอดดักแก๊สคว่ำอยู่ ความเจือจางละ 3 หลอด รวม 9 หลอด (ให้สังเกตด้วยว่าไม่มีฟองอากาศอยู่ในหลอดดักแก๊ส) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 °C เริ่มนับหลอดที่เกิดแก๊สที่เวลา 24 ± 2 ชั่วโมง สำหรับหลอดที่ไม่เกิดแก๊สให้บ่มต่อไปอีก ให้ครบเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง เลือกหลอดที่เกิดแก๊ส และบันทึกผล

2. MPN - Confirmed test for *Escherichia coli*

ถ่ายเชื้อจากหลอด LST ที่เกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส ลงใน EC broth ที่มีหลอดดักแก๊สคว่ำอยู่หลอดละ 1 loop โดยถ่ายเชื้อหลอดต่อหลอด นำ EC broth ไปบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 45.5 ± 0.2 °C เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง เริ่มนับหลอดที่เกิดแก๊สที่เวลา 24 ± 2 ชั่วโมง ถ้าให้ผล negative (ไม่เกิดแก๊ส) ให้บ่มต่อไปอีกจนครบเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง คัดเลือกหลอด EC broth ที่เกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส นำไปอ่านค่าจากตาราง MPN 3:3:3

3. MPN - Completed test for *Escherichia coli*

ใช้หัวถ่ายเชื้อจาก EC broth ที่เกิดแก๊สมา Streak บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ L-EMB agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. coli* บน EMB agar จะมีลักษณะสีม่วงหรือดำ ตรงกลางโคโลนีมีสีดำ อาจมีหรือไม่มีลักษณะมันวาวคล้ายโลหะ (Metallic sheen) เลือกโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวมา Streak บน PCA Slant จำนวน 5 โคโลนี นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีต่อไป

หมายเหตุ ในขั้นตอนการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ก่อนนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี สามารถเลือก 1 โคโลนี ก็เพียงพอแล้วในการพิจารณาผล positive ในหลอด EC broth ดังนั้น ไม่จำเป็นต้องเลือก 5 โคโลนี ในการทดสอบชีวเคมีก็ได้

4. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

4.1 ทดสอบการสร้าง Indole

ถ่ายเชื้อจาก PCA Slant ใส่ในหลอด Tryptone broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 °C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบการสร้าง Indole โดยหยดสารทดสอบ Kovac ' s reagent 0.2 - 0.3 มิลลิลิตร หากเชื้อสามารถสร้าง Indole ได้ จะเกิดวงแหวนสีแดงอ่านผลเป็นบวก ส่วนผลลบจะไม่เกิดวงแหวนสีแดง

4.2 การทดสอบ Voges-Proskauer (VP)

ถ่ายเชื้อจาก PCA Slant ใส่ในหลอด MR-VP medium นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง ตูมมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเปล่าขนาด 13×100 มิลลิเมตร ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำมาหยดสาร α -naphthol 0.6 มิลลิลิตร, 40% KOH 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และเติมผง creatine เล็กน้อย เขย่าให้ผสมกัน อ่านผลภายใน 2 ชั่วโมง หากเกิดสีชมพูแดงอ่านผลเป็นบวก และไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงอ่านผลเป็นลบ

4.3 การทดสอบ Methyl red (MR)

หลังจากทดสอบ VP แล้วให้บ่ม MR-VP medium ต่อไปอีกให้ครบ 48 ± 2 ชม. ที่อุณหภูมิ $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ จากนั้นนำมาทดสอบ Methyl Red โดยค่อย ๆ หยดสารทดสอบ Methyl red 5 หยด หากสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดง อ่านผลเป็นบวก แต่ถ้าเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่านผลเป็นลบ

4.4 การทดสอบการใช้ Citrate

ถ่ายเชื้อจาก PCA Slant ลงใน Koser's citrate broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 96 ± 2 ชั่วโมง หากอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น อ่านผลเป็นบวก ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนแปลง อ่านผลเป็นลบ *E.coli* จะให้ผลลบเสมอ

4.5 การทดสอบการสร้างแก๊สจากน้ำตาล Lactose

ถ่ายเชื้อจาก PCA Slant ลงในหลอด LST นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง ถ้าเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊สอ่านผลเป็นบวกคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *E. coli*

ตาราง 11 สรุปคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *E. coli*

ชนิดของ <i>E. coli</i>	Indole	MR	VP	Citrate
<i>E. coli</i> Type I	+	+	-	-
<i>E. coli</i> Type II	-	+	-	-

5. การรายงานผล

นับจำนวนหลอดที่พบเชื้อ *E. coli* ของแต่ละความเจือจาง นำไปอ่านค่าจากตาราง MPN 3:3:3 และ รายงานผลเป็น MPN/g ตัวอย่าง

3. การวิเคราะห์คุณภาพ *Clostridium perfringens* (BAM, 2001)

อุปกรณ์

- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
- ตู้อบฆ่าเชื้อ

- ตู้บ่มเชื้อ
- เครื่องซั่ง 2 ตำแหน่ง
- เครื่องตีตัวอย่าง
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- จานเลี้ยงเชื้อ
- แผ่นกระจกสไลด์
- ปิเปต
- ตะเกียงแก๊ส
- แอลกอฮอล์ (70% v/v)
- ห่วงเขี่ยเชื้อ
- เข็มเขี่ยเชื้อ
- เครื่องนับโคโลนี
- Anaerobic jars + Gas Pack
- Test kit for *Clostridium perfringens*
- Egg yolk emulsion, 50%

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารทดสอบ

- SFP Agar Base (SFP)
- D-cycloserine solution
- Tryptose-sulfite-cycloserine agar ที่ผสม Egg yolk
- Thioglycollate broth (TB)
- Motility nitrate medium
- Lactose gelatin medium
- Peptone dilution fluid
- Cooked meat medium
- Spray's fermentation medium
- Iron-milk medium
- Gram stain reagent
- Bromthymol blue, 0.04 % aqueous solution
- Nitrate detection reagent: (Reagent A, Reagent B)
- API ID

ขั้นตอนและวิธีการทดสอบ

- การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง 25.0 $\pm$ 0.1 กรัม เติม Peptone dilution fluid (PDF) จำนวน 225 มิลลิลิตร ปั่นตัวอย่างด้วยเครื่องตีปั่น ความเร็วรอบต่ำ เวลา 1-2 นาที จากนั้นทำการเจือจางให้ได้ระดับการเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-6} โดยปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวด PDF 90 มิลลิลิตร จะได้ความเจือจาง 10^{-2} เขย่าให้เชื้อกระจายทั่วทั้งขวด เขย่า 90 มิลลิลิตร ส่วนที่ความเจือจาง 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} ให้เตรียมในลักษณะเดียวกัน แต่ใช้ตัวอย่างที่มีความเจือจางจากขวด 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} ตามลำดับ

- การทดสอบ

1. โดยวิธี pour plate

เท plate อาหาร SFP without egg yolk agar ประมาณ 6-7 มิลลิลิตร ตั้งไว้ให้แข็งตัว ปิเปตสารละลายตัวอย่าง จำนวน 1 มิลลิลิตรต่อเพลท (ระดับความเจือจางละ 2 เพลท) เทอาหารด้วย SFP without egg yolk (ซึ่งอุ่นไว้ใน water bath อุณหภูมิ 45 -50 °C) ประมาณ 15 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันโดยการหมุนเพลทเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัว หงายเพลทแล้วนำไปใส่ใน anaerobic jar บ่มที่ 35 $\pm$ 2 °C เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะโคโลนี สีดำ ขนาด 2-4 มม. มีโซนใสขาวรอบโคโลนี ช่วง 20 -200 โคโลนี คำนวณผลเบื้องต้น เก็บเพลทไว้สำหรับการทดสอบต่อไป

2. โดยวิธี Spread plate

เตรียมอาหาร SFP -agar with egg yolk จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง จำนวน 0.1 มิลลิลิตรต่อเพลท (ระดับความเจือจางละ 2 เพลท) เกลี่ยให้ทั่วด้วยแท่งแก้ว sterile หลังจากรอให้ผิวหน้าอาหารแห้ง (ประมาณ 5 นาที) เททับผิวหน้าด้วย SFP without egg yolk ประมาณ 10 มิลลิลิตร หงายเพลทแล้วนำไปใส่ใน anaerobic jar บ่มที่ 35 $\pm$ 2 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะโคโลนี สีดำ ขนาด 2-4 มม. มีโซนใสขาวรอบโคโลนี ช่วง 20 -200 โคโลนี คำนวณผลเบื้องต้น เก็บเพลทไว้สำหรับการทดสอบต่อไป

3. การใส่เชื้อลงใน cooked meat medium (CMM) เพื่อใช้เป็น back up นำหลอดอาหาร CMM จุ่มในน้ำเดือด 10 นาที เพื่อไล่อากาศ จากนั้นรีบทำให้เย็น ระวังไม่ให้เกิดการกระทบกระเทือนเพื่อป้องกัน O₂ ละลายลงใน media หลังไล่ความร้อนออกแล้ว จากนั้นปิเปต 2 มิลลิลิตร ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} จำนวน 3-4 หลอด บ่มที่ 35 $\pm$ 2 °C เวลา 24-48 ชม. ที่ในกรณีที่ผลของ *C. perfringens* ใน plate count ให้ผลบวกให้ทั้งเชื้อที่ใช้สำหรับเป็น back up ได้

4. Presumptive confirmation test

4.1 เลือกโคโลนีที่แสดงลักษณะเด่น (โคโลนีมีสีดำ มีโซนใสขาวรอบโคโลนี มีขนาด 2-4 mm) จำนวน 10 โคโลนี จาก SFP หรือ SFP egg yolk agar plate ถ่ายเชื้อลงใน Thioglycollate broth 1 โคโลนี ต่อ 1 หลอด บ่มที่ 35 $\pm$ 2 °C เวลา 18-24 ชม.

4.2 สุ่มตรวจ purity ของเชื้อ *C. perfringens* โดยการย้อมแกรม ลักษณะแกรมของ *C. perfringens* ติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อนสั้น หนา หากมีการ contaminate ให้ streak ลงบน SFP agar with egg yolk ใส่ใน anaerobic jar บ่มที่ 35 ± 2 °C เวลา 24 ชม. จะได้โคโลนีของ *C. perfringens* ลักษณะสีขาวเหลือง ขนาด 2-4 มม. มี opaque zone สีเหลืองรอบโคโลนี แสดงว่าแบคทีเรียสามารถใช้ lecithin ในไข่แดงได้ (lecithinase activity)

5. ทดสอบ Iron –milk presumptive test

ปิเปต เชื้อจาก Thioglycollate broth จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน iron-milk medium (modified) จากนั้นนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 46 ± 0.5 °C เป็นเวลา 2 ชม. สังเกต ลักษณะ “Stormy fermentation” แสดงว่าเกิดการรวมตัวของน้ำนมเป็นกลุ่มก้อน ลักษณะของ stormy fermentation จะหมดไปภายใน 5 ชม.

6. Complete confirmation

6.1 Stab เชื้อบริสุทธิ์จาก fluid thioglycollate medium culture หรือโคโลนีที่แยกได้จาก SFP plate ด้วย loop ขนาด 2 มม. 1 loopfuls ลงใน motility-nitrate และ lactose-gelatin media (ทำการล้าง loop ลง beaker น้ำอุ่น ก่อนเผา loop เพื่อป้องกันการกระเด็น)

6.2 บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 °C เวลา 24 ชั่วโมง

- Lactose-gelatin medium: เกิดแก๊สและอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 1 ชม. แล้วนำมาอ่านผลการย่อย gelatin หากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว อ่านผลการย่อย gelatin เป็นบวก หากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเป็น gel ให้บ่มต่อที่ $35 - 37$ °C นาน 24 ชม. แล้วตรวจสอบ gelatin liquefaction หากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ผลการย่อย gelatin เป็นบวก หากอาหารเลี้ยงเชื้อยังคงแข็ง ผลการย่อยเป็นลบ

- Motility-nitrate medium : เชื้อเจริญในแนว stab แต่ไม่เจริญนอกแนว stab จากนั้นนำมาทดสอบการ reduce nitrate โดยการหยดสารทดสอบ reagent A ปริมาตร 0.5 มล. และ reagent B ปริมาตร 0.2 มล. ลงในหลอด หากเกิดสีม่วงขึ้นแสดงว่า nitrate ถูกเปลี่ยนเป็น nitrite ถ้าไม่มีสีม่วงเกิดขึ้นภายใน 5 นาที ให้ใส่ผงสังกะสีลงไปเล็กน้อย ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที หากยังไม่มีสีม่วงเกิดขึ้นอีก แสดงว่า nitrate ถูก reduce หมดไปอย่างสมบูรณ์ แต่ถ้าใส่ผงสังกะสีแล้วเกิดสีม่วงขึ้นแสดงว่า nitrate ยังไม่ได้ถูก reduce โดยเชื้อ ยังมี nitrate เหลืออยู่ ซึ่งถูก reduce โดยผงสังกะสี แทนเชื้อ *C. perfringens* สามารถ reduce nitrate เป็น nitrite ได้ แต่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ดังนั้น จะไม่เห็นการเจริญนอกแนวปลูกเชื้อ และเมื่อหยด reagent A และ reagent B แล้วจะสังเกตเห็นสีม่วง

- Spray's fermentation medium:

1. ปิเปต 0.1 มล. จาก pure fluid thioglycollate ลงใน freshly Spray's fermentation medium ดังนี้

หลอดที่ 1 Spray's fermentation medium + 1% salicin

หลอดที่ 2. Spray's fermentation medium + 1% raffinose

หลอดที่ 3 Spray's fermentation medium ที่ไม่มีส่วนผสมของ

คาร์โบไฮเดรต

2. บ่มที่ $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นดูว่า เกิดกรดและแก๊สหรือไม่ การทดสอบว่ามีกรดหรือไม่ ให้นำเชื้อในหลอดมา 1 มล. จากนั้นเติม 0.04% bromthymol blue จำนวน 1-2 หยด จะพบว่ากลายเป็นสีเขียวอ่อนหรือเหลืองแสดงว่าเป็นกรด นำหลอดที่ 1 มาบ่มต่อที่ $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 24 ชั่วโมง และหลอดที่ 2 ให้บ่มต่อที่ $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบการเกิดกรดและแก๊ส

ผลเชื้อ *C. perfringens* ในหลอดที่ 1 ไม่เกิดกรดและแก๊ส ส่วนหลอดที่ 2 จะพบว่าเกิดกรดและแก๊ส ส่วนในหลอดที่ 3 พบว่าไม่เกิดกรด แต่อาจพบว่าการเปลี่ยน pH เล็กน้อย

ตาราง 12 สรุปคุณสมบัติของเชื้อ *C. perfringens*

Media	คุณสมบัติ	<i>C. perfringens</i>
Lactose – gelatin	การสร้างแก๊สจาก Lactose	+
	การสร้างกรด Lactose	+
	ความสามารถในการย่อย gelatin	+
Motility – nitrate	ความสามารถในการเคลื่อนที่	-
	Reduce Nitrate เป็น Nitrite	+
	แกรมและรูปร่าง	แกรม +, รูปท่อน (Bacilli)
freshly Spray's fermentation medium ที่มี 1% salicin	การสร้างแก๊ส	-
	การสร้างกรด	-
freshly Spray's fermentation medium ที่มี 1% raffinose	การสร้างแก๊ส	+
	การสร้างกรด	+
freshly Spray's fermentation medium ที่ไม่มีคาร์โบไฮเดรต	การสร้างแก๊ส	-
	การสร้างกรด	- (may slightly change)

นำเชื้อที่ให้ผลการทดสอบตรงตามลักษณะข้างต้นมาทดสอบด้วย Rapid Diagnostic Kits API ID32A โดยนำเชื้อจาก Thioglycollate broth มา streak บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ SFP โดยไม่ต้องเททับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 -37° C 24 ชม. ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน (ใน anaerobic jar) ก่อนนำมาทดสอบด้วย API ID 3

5. การรายงานผล

รายงานผลปริมาณเชื้อ *Clostridium perfringens* (CFU/ g)

4. การวิเคราะห์คุณภาพ *Staphylococcus aureus* (BAM, 2001)

อุปกรณ์

- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
- ตู้อบฆ่าเชื้อ
- ตู้บ่มเชื้อ
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
- เครื่องตีตัวอย่าง
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- จานเลี้ยงเชื้อ
- แผ่นกระจกสไลด์
- ปิเปต
- ตะเกียงแก๊ส
- แอลกอฮอล์ (70% v/v)
- ห่วงเขี่ยเชื้อ
- เข็มเขี่ยเชื้อ
- แผ่นกระจกสไลด์

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารทดสอบ

- Butterfield's phosphate-buffered dilution water (BF)
- Trypticase (tryptic) soy agar (TSA)
- Trypticase (tryptic) soy broth (ที่มี NaCl ผสมอยู่ 10% และมี Sodium pyruvate ผสมอยู่ 1%)(TSB)
- Baird-parker medium (ที่มี Egg Yolk tellurite ผสมอยู่) (BP)
- Brain heart infusion (BHI) broth
- Coagulase plasma (rabbit) with EDTA
- Tolidine blue-DNA agar

- Lysostaphin (Schwartz-Mann, Mountain View Ave., Orangebury, NY 10962)

- Yeast extract agar
- Parafin oil, sterile
- 0.02 M phosphate-saline buffer Containing 1 % NaCl
- Catalase test

วิธีการทดสอบ

- การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง 50.0 ± 0.1 กรัม ใส่ในถุง stomacher เติม Butterfield's phosphate-buffered dilution water (BF) 450 มิลลิลิตร ตีให้ตัวอย่างกระจายทั่วสารละลายด้วยเครื่องตีตัวอย่าง เป็นเวลา 1 นาที สารละลายตัวอย่างที่ได้ถือว่ามีความเจือจาง 10^{-1} (ตัวอย่างถูกเจือจาง 10 เท่า) เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีความเจือจางเพิ่มขึ้น 100 และ 1,000 เท่า (นั่นคือตัวอย่างมีความเจือจาง 10^{-2} และ 10^{-3} ตามลำดับ) หรือระดับความเจือจางที่เหมาะสม โดย ปิเปตตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1} จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดที่มี BF 90 มิลลิลิตร จะได้ระดับความเจือจาง 10^{-2} นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าให้เชื้อกระจายทั่วกันทั้งขวด ส่วนที่ระดับความเจือจาง 10^{-3} ก็เตรียมได้ในลักษณะเดียวกัน

- การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี MPN

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} ระดับความเจือจางละ 1 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ ใส่ในหลอด TSB + 10% NaCl + 1% sodium pyruvate ระดับความเจือจางละ 3 หลอด รวม 9 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง คัดเลือกหลอดที่ขึ้นเนื่องจากการเจริญของเชื้อและจดบันทึกจำนวนหลอด จากนั้นเขย่าหลอดโดยใช้ Vortex mixer แล้วใช้ loop ทำการ streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BP นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง โดยกลับเพลทให้อาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ด้านบน ลักษณะโคโลนีของ *S. aureus* โคโลนีกลม เรียบ โค้งนูน มีความชุ่มชื้น ไม่แห้ง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร โคโลนีมีสีเทาถึงดำ อาจมีขอบใสหรือไม่ก็ได้ มีโซนทึบ (opaque zone) รอบๆ โคโลนี และมีโซนใส (clear zone) รอบนอกโคโลนี หรือไม่ก็ได้ เมื่อใช้เข็มเย็บจะยืดเหนียว (ในบางครั้งอาจพบโคโลนีในลักษณะคล้ายกันแต่ไม่พบ opaque zone และ clear zone รอบโคโลนีแสดงว่าไม่ใช่ *S. aureus*) ถ้าตัวอย่างที่นำมาตรวจวิเคราะห์เก็บไว้นาน หรือตัวอย่างแห้ง อาจพบว่าเชื้อนี้อาจให้ลักษณะโคโลนีสีน้ำตาล และโคโลนีมีลักษณะแห้งเลือกโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวจำนวนอย่างน้อย 1 โคโลนีต่อความเข้มข้น ถ้ายกลงใน BHI และ TSA slant นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง นำหลอด TSA slant มาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้ในการทดสอบ API หรือทดสอบ Ancillary test ในกรณีที่ผล coagulase test มีระดับการจับตัวเป็นก้อนน้อยกว่า 4+

1. Coagulase test

ปิเปตเชื้อจากหลอด BHI broth ปริมาตร 0.2-0.3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเปล่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเติม coagulase plasma ที่มีส่วนผสมของ EDTA ลงไป 0.5 มิลลิลิตร เขย่าหลอดให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ สังเกต การจับตัวทุกๆ ชั่วโมงในระยะเวลา 4 ชั่วโมงแรก หากไม่เกิดการจับตัวภายในระยะเวลาดังกล่าวให้ทำการบ่มต่ออีกจนครบ 24 ชั่วโมง แล้วทำการอ่านผล (BD BBL Coagulase Plasma) ระดับของการจับตัวกันของเชื้อและ Coagulase Plasma ระดับของการจับตัว ลักษณะที่ปรากฏ

0 ไม่เกิดการจับตัว

1+ จับตัวเป็นก้อนน้อย ไม่รวมกลุ่ม

2+ จับตัวเป็นก้อนน้อย รวมกลุ่ม

3+ จับตัวเป็นก้อนใหญ่

4+ จับตัวเป็นก้อนหมดทั้งหลอด และไม่ขยับเมื่อคว่ำหลอด

2. Ancillary test

a) Catalase test

- นำ TSA slant จากข้อ 5.4.2 มาทดสอบโดยใช้ loop ต่เชื้อจาก TSA slant ลงบนสไลด์จากนั้นหยดสารทดสอบ 3 % H_2O_2 ลงบนโคโลนี สังเกตการสร้างฟองแก๊ส O_2

- *S.aureus* จะให้ผล Catalase test เป็นบวก คือมีการสร้างฟองแก๊ส O_2

b) Anaerobic utilization of glucose

- นำ TSA slant จากข้อ 5.4.2 มาทดสอบโดยถ่ายเชื้อ 1 loop จาก TSA slant ลง Carbohydrate fermentation medium ที่มี 0.5% glucose ลงไปบริเวณก้นหลอด ปิดทับผิวหน้าด้วย sterile paraffin oil ให้สูงขึ้นมาประมาณ 25 มิลลิเมตร นำไปบ่มที่ $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 5 วัน (ในขั้นตอนนี้ให้ทำ positive culture , Negative culture และ medium control ควบคู่ไปด้วย) สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ

- *S.aureus* จะให้ผล Anaerobic utilization of glucose เป็นบวก คืออาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเนื่องจากการสร้างกรด

c) Anaerobic utilization of mannitol

- วิธีการทดสอบทำเช่นเดียวกับ Anaerobic utilization of glucose แต่เปลี่ยนจาก glucose เป็น mannitol

- *S.aureus* จะให้ผลบวกในการทดสอบนี้ แต่มีบางสายพันธุ์ที่ให้ผลเป็นลบ ดังนั้นควรทำ Control ควบคู่ไปด้วย

d) Lysostaphin sensitivity

- นำ TSA slant มาทดสอบโดย streak ลงบน TSA plate นำไปบ่มที่ 35 ± 1 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 1 โคโลนีจาก TSA plate ลงใน phosphate-saline buffer 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน คูดสารละลายที่มีเชื้อผสมอยู่มา 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดเปล่า ขนาด 13X100 มิลลิเมตร แล้วเติม phosphatesalinebuffer ลงไป 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ใช้เป็น Control เติม lysostaphin 0.1 มิลลิลิตร (ถูกละลายด้วย 0.02 M phosphate-saline buffer ที่มี 1%NaCl) ลงใน Coagulase test ให้ผลการทดสอบน้อยกว่าระดับ 4+ ให้นำไปทดสอบ API หรือ Ancillary test บันทึกผลเป็นบวกเมื่อการทดสอบด้วย API และ Ancillary test เข้าข่าย *S.aureus* และบันทึกผลเป็นลบ เมื่อลักษณะการจับตัวอยู่ในระดับ 0 และการทดสอบด้วย API และ Ancillary test ไม่เข้าข่าย *S.aureus*

e) Thermostable nuclease production

ทำการทดสอบเมื่อผลการทดสอบ Coagulase test ให้ผลการทดสอบ 2+

- การเตรียมสไลด์ เคลือบแผ่นสไลด์ด้วย Toluidine blue-deoxyribonucleic acid agar ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เมื่อวันแข็ง ตัดเป็นชิ้นๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิลิตร (ได้ 10-12 pcs/slide) แยกเป็นวันแต่ละชิ้นให้ออกห่างกัน

- การเตรียมเชื้อทดสอบ และวิธีทดสอบ นำ TSA slant มาทดสอบโดยการถ่ายเชื้อลงใน BHI broth 0.2-0.3 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 35 ± 1 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำไปต้มให้เดือดใน water bath เป็นเวลา 15 นาที ถ่ายเชื้อ 0.01 มิลลิลิตร ลงบนชิ้นวุ้นที่เตรียมไว้ นำไปบ่มใน moist chamber ที่ 35 ± 1 °C นาน 4 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสี คือ จะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพูอย่างน้อยประมาณ 1 มิลลิลิตร บนชิ้นวุ้น

- *S.aureus* จะให้ผลบวกในการทดสอบนี้ คือ เปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู

- การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Direct Plate Count

ปิเปตสารละลายตัวอย่างในแต่ละระดับความเจือจางมา 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ BP จำนวน 3 เพลทๆ ละ 0.3, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตร จากนั้นเกลี่ยให้เชื้อกระจายโดยใช้แท่งแก้ว ทิ้งให้สารละลายของเชื้อซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ (ประมาณ 10 นาที) นำเพลทไปบ่มโดยกลับเพลท บ่มที่ 35 ± 1 °C นาน 45-48 ชั่วโมง (แต่ถ้าสารละลายยังไม่ซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อให้นำไปบ่มในตูบ่มเชื้อโดยไม่ต้องกลับเพลท เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนกลับเพลท) เลือกเพลทที่มีจำนวนโคโลนี 20-200 โคโลนี มาตรวจนับโคโลนีลักษณะโคโลนีของ *S. aureus* โคโลนีกลม เรียบ โค้งมน มีความชุ่มชื้น ไม่แห้ง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร โคโลนีมีสีเทาถึงดำ อาจมีขอบใสหรือไม่ก็ได้ มีโซนทึบ (opaque zone) รอบๆ โคโลนี และมีโซนใส (clear zone) รอบนอกโคโลนี หรือไม่ก็ได้ เมื่อใช้ needle เขี่ยจะยืดเหนียว (ในบางครั้งอาจพบโคโลนีในลักษณะคล้ายกันแต่ไม่พบ opaque zone และ clear zone รอบโคโลนีแสดงว่าไม่ใช่ *S. aureus*) ถ้า

ตัวอย่างที่นำมาตรวจวิเคราะห์เก็บไว้นาน หรือตัวอย่างแห้ง อาจพบว่าเชื้อนี้อาจให้ลักษณะโคโลนีสีดำจาง และโคโลนีมีลักษณะแห้ง

การนับจำนวนโคโลนี ถ้ามีโคโลนีหลายๆ ลักษณะ นับจำนวนโคโลนีแต่ละลักษณะ และบันทึกจำนวนแยกแต่ละลักษณะ กรณีที่ในระดับความเจือจางต่ำสุดจำนวนโคโลนีที่นับได้น้อยกว่า 20 โคโลนีให้ใช้ค่าที่นับได้นี้ นำไปทดสอบ Coagulase test และรายงานผลได้ แต่ถ้าในเพลทที่มีจำนวนโคโลนีมากกว่า 200 โคโลนี และไม่มีลักษณะเด่นของ *S.aureus* ในระดับความเจือจางสูงกว่านี้ ให้นับจำนวน โคโลนีที่มีลักษณะเด่นของ *S.aureus* จากนั้นเลือกโคโลนีในแต่ละลักษณะมา มากกว่า 1 โคโลนีต่อ ความเข้มข้น เพื่อทดสอบ Coagulase Test ต่อไป

- การรายงานผล

1. วิธี MPN: นำไปอ่านค่าจากตาราง MPN 3:3:3 รายงานผล *Staphylococcus* Coagulase Positive ที่ได้ โดยมีหน่วยเป็น MPN/g ตัวอย่าง กรณีตรวจโดยวิธี MPN

2. วิธี Direct Plate Count: จำนวนโคโลนี ของ *S.aureus* ที่นับได้คูณระดับความเจือจาง โดยมีหน่วยเป็น CFU/g ตัวอย่าง กรณีทำการ spread plate

5. การวิเคราะห์คุณภาพ *B.cereus* (BAM, 2002)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Mannitol-egg yolk-polymyxin (MYP) agar
- สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

การเตรียมตัวอย่าง

- ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ลงในขวดปลอดเชื้อ
- เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 90 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วยความเร็วต่ำเป็นเวลา 1 นาที นำไปตั้งในตู้เย็น 30 นาที
- ทำการเจือจางให้ 1: 10, 1:100 และ 1:1000 ตามลำดับ โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

การตรวจนับ *B.cereus*

- เตรียม MYP agar เทลงจานเพาะเชื้อ จากนั้นหาคัดตัวอย่างปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร จากนั้น Spread บนอาหาร MYP agar
- นำจานเพาะเชื้อที่ผ่านการ Spread เชื้อ เข้าตู้อบเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิ 30 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะรอบๆ โคโลนีจะขุ่น โดยโคโลนีจะมีสีชมพู บันทึกผล พร้อมกับทดสอบขั้นต่อไป

- เชื้อเชื้อที่มีลักษณะที่สงสัยลงใน อาหาร Nutrient agar slant เลี้ยงเชื้อโดยเข้าตู้บ่มเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิ 30 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบโดยการย้อมสีแกรมเพื่อดูลักษณะ

- เตรียมหลอดซึ่งบรรจุสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าตัวอย่างด้วย vortex ทดสอบขั้นยืนยัน โดยวิธี Nitrate broth, Phenol red glucose และ Modified VP medium

ภาคผนวก ง
แบบสอบถามและแบบประเมิน

**แบบสอบถาม การศึกษา การสำรวจพฤติกรรม ทักษะ และความต้องการของผู้บริโภค
ที่มีต่อผลิตภัณฑ์อาหารหมักส้มเท่าั่ว**

แบบสอบถามฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพฤติกรรม ทักษะ และความต้องการของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์อาหารหมักส้มเท่าั่ว ข้อมูลทุกอย่างจะนำมาใช้ประโยชน์เพื่องานวิจัย ไม่มีการเปิดเผยชื่อผู้ตอบเป็นรายบุคคล ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าท่านจะให้ความร่วมมือตอบแบบสอบถามทุกข้อตามความเป็นจริงมากที่สุด

แบบสอบถาม แบ่งเป็น 4 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไปของผู้ตอบแบบสอบถาม

ส่วนที่ 2 พฤติกรรมและทักษะของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์อาหารหมักส้มเท่าั่ว

ส่วนที่ 3 ความต้องการของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์อาหารหมักส้มเท่าั่ว

ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับผู้ตอบแบบสอบถาม

คำชี้แจง : กรุณาใส่เครื่องหมาย ✓ ในวงเล็บ () ที่ท่านเห็นว่าตรงกับความคิดเห็นของท่านมากที่สุด และกรุณาตอบให้ครบทุกข้อ

1. เพศ

1.() ชาย

2.() หญิง

2. อายุ

1.() ต่ำกว่าหรือเทียบเท่า 17 ปี

2.() 18-25 ปี

3.() 26- 44 ปี

4.() 45 ปีขึ้นไป

3. อาชีพ

1.() ข้าราชการและพนักงานรัฐวิสาหกิจ

2.() พนักงานบริษัทเอกชน

3.() ธุรกิจส่วนตัว

4.() แม่บ้าน / พ่อบ้าน

5.() นักเรียน / นักศึกษา

6.() อื่นๆ โปรดระบุ.....

4. รายได้รวมเฉลี่ยของครอบครัวต่อเดือน (ที่อาศัยอยู่ด้วยกัน)

1.() ต่ำกว่าหรือเทียบเท่า 5,000 บาท

2.() 5,001-10,000 บาท

3.() 10,001-15,000 บาท

4.() 15,001-20,000 บาท

5.() 20,001-30,000 บาท

6.() มากกว่า 30,000 บาท

5. ระดับการศึกษา

- 1.() ต่ำกว่ามัธยมศึกษาตอนปลาย 2.() มัธยมศึกษาตอนปลายหรือ ปวช.
 - 3.() อนุปริญญาหรือ ปวส. 4.() ปริญญาตรี
 - 5.() ปริญญาโท 6.() ปริญญาเอก
6. สถานภาพทางครอบครัว
- 1.() โสด 2.() สมรส / อยู่ด้วยกัน
 - 3.() หม้าย/อย่าร้าง/แยกกันอยู่

ส่วนที่ 2 พฤติกรรมและทัศนคติของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์อาหารหมักส้มเท้าวัว

คำชี้แจง : กรุณาใส่เครื่องหมาย ✓ ในวงเล็บ () ที่ท่านเห็นว่าตรงกับความคิดเห็นของท่านมากที่สุด และกรุณาตอบให้ครบทุกข้อ

1. ท่านรับประทานส้มเท้าวัวหรือไม่

- 1.() ไม่รับประทาน (ให้ตอบข้อ 2)
- 2.() รับประทาน (ให้ตอบข้อ 3)

2. สำหรับผู้ที่ไม่รับประทานส้มเท้าวัว เพราะเหตุใด (ตอบได้มากกว่า 1 ข้อ)

- 1.() ไม่ชอบกลิ่น 2.() ไม่ชอบรสชาติ
- 3.() ไม่เห็นประโยชน์ของผลิตภัณฑ์ 4.() ไม่มีความปลอดภัยของอาหาร
- 5.() มีราคาแพง 6.() หาซื้อยาก
- 7.() เคี้ยวลำบาก 8.() อื่นๆ (ระบุ).....

3. ท่านรับประทานส้มเท้าวัวบ่อยแค่ไหน

- 1.() ทุกวัน 2.() 2-3 ครั้ง ต่อสัปดาห์
- 3.() 1 ครั้ง ต่อสัปดาห์ 4.() 1 ครั้ง ต่อเดือน
- 5.() อื่นๆ (ระบุ).....

4. ท่านเลือกรับประทานส้มเท้าวัวเพราะเหตุใด (ตอบได้มากกว่า 1 ข้อ)

- 1.() ราคาถูก 2.() รสชาติดี
- 3.() ชอบกลิ่น 4.() หาซื้อง่าย
- 5.() ชอบเนื้อสัมผัส 6.() อื่นๆ (ระบุ).....

ส่วนที่ 3 ความต้องการของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์อาหารหมักส้มเท้าวัว

คำชี้แจง : โปรดกรณใส่เครื่องหมาย ✓ ในวงเล็บ () ที่ท่านเห็นว่าตรงกับความคิดเห็นของท่านมากที่สุด และกรุณาตอบให้ครบทุกข้อ

1. ท่านต้องการทราบคุณค่าทางโภชนาการอาหารของส้มเท้าวัวหรือไม่

- 1.() ต้องการ 2.() ไม่ต้องการ

2. ท่านต้องการให้ผลิตภัณฑ์อาหารหมักส้มเท้าวัวมีความสะอาดมากขึ้นหรือไม่

- 1.() ต้องการ
- 2.() ไม่ต้องการ
3. ท่านต้องการให้ผลิตภัณฑ์อาหารหมักสั้่มเพ้าวมีรสชาติแบบใด
- 1.() เปรี้ยวมากขึ้น
- 2.() เปรี้ยวน้อยลง
- 3.() พอดีแล้ว
- 4.() อื่นๆ

(ឈ្មោះ).....

4. ท่านต้องการให้ผลิตภัณฑ์อาหารหมักสั้มีตัวว้มีรูปแบบของบรรจุภัณฑ์แบบใด
- | | |
|----------------------|-------------|
| 1.() ถุงสุญญากาศ | 2.() ขวด |
| 3.() กระป๋องพลาสติก | 4.() อื่นๆ |

(ឧប្ប).....

5.ข้อเสนอแนะเพื่อการปรับปรุงผลิตภัณฑ์อาหารหมักส้มเท่าั่ว

.....

.....

.....

.....

.....

แบบประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหารหมักส้มเท่าั่ว

แบบสอบถามฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในงานวิจัย ไม่มีการเปิดเผยชื่อผู้ตอบเป็นรายบุคคล ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าท่านจะให้ความร่วมมือตอบแบบสอบถามทุกข้อตามความเป็นจริงมากที่สุด

แบบสอบถาม แบ่งเป็น 2 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไปของผู้ตอบแบบสอบถาม

ส่วนที่ 2 การประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส

ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับผู้ตอบแบบสอบถาม

คำชี้แจง : กรุณาใส่เครื่องหมาย ✓ ในวงเล็บ () ที่ท่านเห็นว่าตรงกับความคิดเห็นของท่านมากที่สุด และกรุณาตอบให้ครบทุกข้อ

1. เพศ

1.() ชาย

2.() หญิง

2. อายุ

1.() ต่ำกว่าหรือเทียบเท่า 17 ปี

2.() 18-25 ปี

3.() 26- 44 ปี

4.() 45 ปีขึ้นไป

3. อาชีพ

1.() ข้าราชการและพนักงานรัฐวิสาหกิจ

2.() พนักงานบริษัทเอกชน

3.() ธุรกิจส่วนตัว

4.() แม่บ้าน / พ่อบ้าน

5.() นักเรียน / นักศึกษา

6.() อื่นๆ โปรดระบุ.....

ส่วนที่ 2 การประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส

คำชี้แจง กรุณาชิมตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมักสั้มเท้าวัวแล้วพิจารณาให้คะแนนแสดงระดับ

ความชอบต่อคุณลักษณะต่างๆ ของผลิตภัณฑ์โรตีสีกรอบที่ตรงกับความรู้สึกของท่านมากที่สุด โดยใช้หลักเกณฑ์การให้คะแนนดังต่อไปนี้

5 = ชอบมาก 4 = ชอบปานกลาง 3 = เฉยๆ 2 = ชอบน้อย 1 = ไม่ชอบ

คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส	คะแนนการประเมินคุณลักษณะรหัส ตัวอย่าง 1					คะแนนการประเมินคุณลักษณะรหัส ตัวอย่าง 2				
	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1
1. ลักษณะทั่วไป										
2. สี										
3. กลิ่น										
4. รสชาติ										
5. เนื้อสัมผัส										
6. ความชอบรวม										

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

.....

ภาคผนวก จ
ประวัติย่อผู้วิจัย

1. หัวหน้าโครงการ

ชื่อ-นามสกุล	นายอรุณ วงศ์จิรฐิติ
ตำแหน่ง	อาจารย์พนักงานมหาวิทยาลัย
สถานที่ติดต่อ	สาขาวิชาชีววิทยาและวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร ต. ธาตุเชิงชุม อ.เมือง จ. สกลนคร 47000
โทรศัพท์มือถือ	083-3341200
E-mail address	mic_610@hotmail.com
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พ.ศ. 2543 วท.ม. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พ.ศ. 2547

2. ผู้ร่วมโครงการ

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสุภา ยศตะโคตร
ตำแหน่ง	อาจารย์พนักงานมหาวิทยาลัย
สถานที่ติดต่อ	สาขาวิชาชีววิทยาและวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร ต. ธาตุเชิงชุม อ.เมือง จ. สกลนคร 47000
โทรศัพท์มือถือ	087 – 9459498
E-mail address	ssuvapa@hotmail.com
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ. 2545 วท.ม. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยนเรศวร พ.ศ. 2549