Thesis Title	Novel and Efficient Protocol to Expedite Total Plate Count (TPC) and Yeast/Mold Detection for Industrial Samples
Thesis Credits	12
Candidate	Miss Orana Rattanabumrung
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Aluck Thipayarat
Program	Master of Engineering
Field of Study	Food Engineering
Department	Food Engineering
Faculty	Engineering
Academic Year	2012

Abstract

This research aimed to propose efficient protocols to accelerate the Total Plate Count (TPC) as well as yeast and mold detection for industrial samples. Micro Inoculation Culture (MIC), together with digital microscopy, was utilized to expedite colony detection and economically improve the analytical cost per sample. Several colony enumeration standards (i.e., Pour plate, Spread plate, and Petrifilm^{TM}) were validated against the MIC technique. The sensitivity and accuracy of each method were compared using pure cultures as well as industrial samples. Plate Count Agar (PCA), Chromocult$^{®}$ Coliform Agar (CCA) and Potato Dextrose Agar (PDA) were used as standard media in the TPC and yeast and mold experiments. The MIC technique requires only 10 µl inoculum as opposed to 100 µl in the case of the spread plate technique and 1000 µL in the cases of the pour plate and Petrifilm^{TM} techniques. The colony count results of the MIC technique were statistically comparable to those of the routine techniques. The validation of the colony counts showed good linearity with the detection limit of higher than 2 log CFU/ml. The colony count results of the frozen ready-to-eat, plasticine and dough clay samples showed similar results to those of the Pour plate technique. In addition, the effect of CCA on *Escherichia coli* colony size and chromatic development was evaluated at different incubation temperatures (i.e., 30, 35, 37, 40 and 45^{o}C). The optimal nutrient composition of Potato Dextrose Broth (PDB) can improve yeast cell multiplication and colony detection. Normally, yeast and mold growth requires 2-5 days.

However, the digital microscopy prototype was able to shorten the yeast and mold colony detection time to approximately 24 h.

Keywords: *Escherichia coli*/ Micro Inoculation Culture/ Mold/ Total Plate Count/ Yeast

หัวข้อวิทยานิพนธ์	นวัตกรรมและกระบวนการที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและยีสต์/ราอย่างรวดเร็วในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
หน่วยกิต	12
ผู้เขียน	นางสาวอรณา รัตนบำรุง
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดร.อาลักษณ์ ทิพยรัตน์
หลักสูตร	วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิศวกรรมอาหาร
ภาควิชา	วิศวกรรมอาหาร
คณะ	วิศวกรรมศาสตร์
ปีการศึกษา	2555

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำเสนอต้นแบบที่มีประสิทธิภาพในการเร่งการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและยีสต์และราในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม โดยใช้เทคโนโลยีการเพาะเชื้อระดับจุลภาค ซึ่งมีกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลสำหรับใช้เร่งการตรวจพบโคโลนีและใช้เพิ่มความคุ้มค่าเชิงเศรษฐศาสตร์ในแง่ของราคาต้นทุนการวิเคราะห์ต่อตัวอย่าง ทั้งนี้ได้ทวนสอบเทคนิคการเพาะเชื้อระดับจุลภาคกับวิธีการทั่วไปที่ใช้ในการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ได้แก่ Pour plate, Spread plate และ Petrifilm™ นอกจากนี้ยังได้ทำการเปรียบเทียบความไวตลอดจนความถูกต้องของแต่ละวิธีโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์และตัวอย่างจากทางภาคอุตสาหกรรม สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ใช้เป็นมาตรฐานในการทดลองหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและยีสต์และราได้แก่ Plate Count Agar (PCA), Chromocult® Coliform Agar (CCA) และ Potato Dextrose Agar (PDA) ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้สำหรับเทคนิคการเพาะเชื้อระดับจุลภาคและเทคนิค Spread plate คือ 10 และ 100 ไมโครลิตร ตามลำดับ และเท่ากับ 1,000 ไมโครลิตร สำหรับเทคนิค Pour plate และเทคนิค Petrifilm™ จากการเปรียบเทียบเชิงสถิติของผลการนับจำนวนจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิคการเพาะเชื้อระดับจุลภาคกับเทคนิคปกติพบว่าเทคนิคทั้งสองให้ค่าที่สอดคล้องกันและมีความสัมพันธ์เป็นแบบเส้นตรง โดยจำกัดการตรวจพบเมื่อจำนวนจุลินทรีย์สูงกว่า 2 log CFU/ml ผลการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างอาหารแช่แข็งพร้อมรับประทานจากภาคอุตสาหกรรม ดินน้ำมัน และแป้งโดว์ พบว่าได้ผลที่คล้ายกันกับการใช้เทคนิค Pour plate นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CCA ที่มีต่อขนาดและการสร้างสีของเชื้อ *Escherichia coli* โดยทำการเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิเพาะบ่มที่แตกต่างกันได้แก่ 30, 35, 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส และยังศึกษาผลขององค์ประกอบของสารอาหารที่เหมาะสมที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) ซึ่งสามารถใช้

ปรับปรุงการเพิ่มจำนวนและการตรวจพบเซลล์ยีสต์ โดยทั่วไปยีสต์และราจะต้องใช้เวลาในการตรวจพบ 2-5 วัน แต่เมื่อใช้ต้นแบบกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลพบว่าสามารถลดระยะเวลาการตรวจพบยีสต์และราเหลือเพียง 24 ชั่วโมง

คำสำคัญ : *Escherichia coli*/ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด/ เทคโนโลยีการเพาะเชื้อระดับจุลภาค/ ยีสต์/ รา

ACKNOWLEDGEMENTS

This research could not have been success without helpful from many people. I would like to express my appreciation and gratitude for the assistance given by those who contributed to fulfill this special research project. First of all, Asst. Prof. Dr. Aluck Thipayarat, who gave good advice and be guidance of this thesis since start until successful. My appreciation goes to all project committee members including, Assoc. Prof. Suwit Siriwatanayotin, Assoc. Prof. Dr. Punchira Vongsawasdi and Asst. Prof. Chanan Phonprapai for giving a momentous suggestion and important information.

I would like to express sincere appreciation to Mrs. Suporn Charoenwattananon and Mr. Arvuth Charoenwattananon for their kind collaboration through the course of this research. Special thanks are extended to The Thailand Research Fund- Master research Grants (TRF- MAG) for their graduate scholarship support.

Moreover, my special gratitude is extended to the professors and all of staff members of Food Engineering Department, KMUTT to give me this great opportunity to progress my knowledge and skills. Furthermore, I would like to thank all the ALUCK Research Team including, Ruamporn Liamkaew, Juthamas Khueankhancharoen, Wipavadee Sangadkit, and Pattarin Supanivatin for not only their helpful suggestions but also how to work with others people as a team. I also want to grateful thanks my friends at Food Engineering and Food Engineering Practice School (FEPS) programs for their support and encouragement, which was often needed desperately when struggling to reach the end.

Finally, my graduation would not be achieved without best wish from my parents, Mr. Suchart and Mrs. Patcharee Supanivatin, who help me for everything and always gives me greatest love, willpower and financial support