ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. de Man Rogosa Sharpe (MRS) broth (de Man *et al.*, 1960)

สูตร

Beef extract	10.00	กรัม
Ycast cxtract	5.00	กรัม
Glucose	20.00	กรัม
Peptone	10.00	กรัม
$CH_3COONa.3H_2O$	5.00	กรัม
K_2HPO_4	2.00	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.20	กรัม
$MnSO_4.4H_2O$	0.05	กรัม
$(NH_4)_3C_6H_5O_7$	2.00	กรัม
Tween 80	1.00	กรัม
น้ำกลั่น	1.00	ลิตร

pH 6.7

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ

ถ้าต้องการใส่ bromocresol green เป็น indicator ให้ใส่สารละลาย bromocresol green 4.0 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 ลิตร (สารละลาย bromocresol green เตรียมโดยใช้ bromocresol green 0.1 กรัม มาละลายใน 0.01 N NaOH 14.3 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา)

เตรียมเป็นอาหารแข็งโดยเติมผงวุ้น 15.0 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. Standard Plate Count Agar (Difco Laboratory, 1984)

สูตร

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	กรัม

pH 7.0

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปตั้งไฟ ต้มจนวุ้นละลายดี บรรจุลงขวด ปิดจุกด้วยสำลี จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ

3. Nutrient agar (Difco Laboratory, 1984)

สูตร

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 6.8

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปตั้งไฟ ต้มจนวุ้นละลายดี บรรจุลงขวด ปิดจุกด้วยสำลี จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอาหารที่ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และวิธีการทดสอบ

1. การย้อมกรัม

สารเคมี

1.1 คริสตัลไวโอเลต (Crystal violet)

ชั่งผงคริสตัลไวโอเลต 2 กรัม ละลายในเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมออกซาเลตร้อยละ 1 ลงไป 80 มิลลิลิตร

1.2 สารละลายไอโอดีน (Iodine)

ชั่งผงไอโอดีน 1 กรัม โพแทสเซียมไอโอไดด์ 2 กรัม น้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

1.3 สารละลายซาฟรานีน (Safranin o solution)

สารละลายซาฟรานีน 10 มิลลิลิตร (เตรียมโดยชั่งซาฟรานีน 2.5 กรัม ในเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร) ผสมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

1.4 Decolourizer (95% ethanol + Acetone, 1:1)

ผสม 95% ethanol และAcetone ในอัตราส่วน 1:1 เก็บไว้ในขวดสีชา

วิธีการ

1. เกลี่ยเชื้อบนสไลด์ที่แห้งและสะอาด ปล่อยให้แห้งและยึดด้วยเปลวไฟ
2. หยดสารละลายคริสตัลไวโอเลตลงบนรอยเกลี่ยทิ้งไว้ 1 นาที ล้างน้ำ 2-3 วินาที แล้วสลัดน้ำออกให้หมด
3. หยดสารละลายไอโอดีน 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ
4. หยด decolourizer เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อล้างสีน้ำเงินของคริสตัลไวโอเลตออกจนสีจางเกือบหมด แล้วล้างออกด้วยน้ำ
5. หยดสารละลายซาฟรานีน 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำ ผึ่งไว้ให้แห้ง นำสไลด์ไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การย้อมสปอร์

สารเคมี

2.1 มาลาไครท์กรีนร้อยละ 5 (Malachite green)

ชั่งมาลาไครท์กรีน 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน กรองสารละลายเก็บในขวดสีชา

2.2 สารละลายซาฟรานีน (Safranin o solution)

สารละลายซาฟรานีน 10 มิลลิลิตร (เตรียมโดยชั่งซาฟรานีน 2.5 กรัม ในเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร) ผสมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2.3 Decolourizer (95% ethanol + Acetone, 1:1)

ผสม 95% ethanol และAcetone ในอัตราส่วน 1:1 เก็บไว้ในขวดสีชา

วิธีการ

1. เกลี่ยเชื้อบนสไลด์ที่แห้งและสะอาด ปล่อยให้แห้งและยึดด้วยเปลวไฟ
2. หยดสารละลายมาลาไครท์กรีนร้อยละ 5 ให้ท่วมรอยเกลี่ยเชื้อ
3. นำสไลด์วางเหนือเปลวไฟของตะเกียงบุนเสน 10 นาที คอยเติมสารละลายมาลาไครท์กรีน เพื่อไม่ให้สารละลายบนสไลด์แห้ง
4. ล้างสีออกด้วยน้ำสะอาด แล้วชะล้างด้วย decolourizer เป็นเวลา 15 วินาที
5. ล้างออกด้วยน้ำสะอาด หยดสารละลายซาฟรานีน 30 วินาที
6. ล้างสีออกด้วยน้ำสะอาด ผึ่งสไลด์ให้แห้ง จากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตัวเซลล์จะติดสีแดงของซาฟรานีน ส่วนสปอร์จะติดสีเขียวของมาลาไครท์กรีน

3. การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase) (Faddin, 1976)

สูตร

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน บรรจุในขวดสีชา เก็บในอุณหภูมิตู้เย็น

วิธีการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 3 ลงบนโคโลนีแบคทีเรียที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหาร MRS agar ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่าเป็นผลบวก เชื้อมีการสร้างเอนไซม์คะตาเลส

4. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) (faddin, 1976)

สูตร

Tetramethyl-p-phenyl diamine dihydrochloride	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 15 นาทีก่อนใช้ เก็บรักษาไว้ในขวดหุ้มฟอยล์ (foil) เพื่อไม่ให้ถูกแสง และเก็บในอุณหภูมิตู้เย็น

วิธีการ

หยดสารละลาย Tetramethyl-p-phenyl diamine dihydrochloride เข้มข้นร้อยละ 0.1 ลงบนกระดาษ Whatman เบอร์ 1 ใช้ loop เขี่ยเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงที่เจริญบนอาหาร MRS agar ที่ต้องการทดสอบ ขีดไปบนกระดาษกรองเป็นเส้นยาว 1 เซนติเมตร สังเกตการเปลี่ยนแปลงภายใน 30 วินาที ถ้าเกิดสีม่วงตามแนวขีดแสดงว่ามีผลเป็นบวก แบคทีเรียที่ทดสอบมีการสร้างเอนไซม์ ออกซิเดส

5. การทดสอบการเคลื่อนที่ (Difo Laboratory, 1984)

สูตร

Tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Agar	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.0

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือด บรรจุในหลอด แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการ

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร motility test medium โดย inoculate เชื้อด้วยเข็มเขี่ยเชื้อปลายแหลมลงไป 1/2-3/4 ของหลอดทดสอบ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-40 ชั่วโมง ถ้าแบคทีเรียสามารถเคลื่อนที่ได้ จะมีลักษณะขุ่นมัวโดยรอบจากรอยที่แทงไว้

6. การทดสอบออกซิเดชัน และเฟอร์เมนเตชัน (Faddin, 1976)

สูตร

Glucose	10.0	กรัม
Tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
K_2HPO_4	0.3	กรัม
Agar	3.0	กรัม
Bromocresol green	0.004	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.0

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้นกลูโคสในน้ำกลั่น เติม bromocresol green เพื่อเป็นอินดิ เคเตอร์ (สารละลาย bromocresol green เตรียม โดยใช้ bromocresol green 0.1 กรัม มาละลายใน 0.01 N NaOH 14.3 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา) แล้วเติมกลูโคสลงไป จากนั้นบรรจุใส่หลอดทดสอบ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการ

เลี้ยงเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายแหลมแทงลงไปในหลอดอาหาร จำนวน 2 หลอด หลอดแรกปิดทับด้วยพาราฟินเหลวปราศจากเชื้อหนา 2-3 เซนติเมตร เพื่อให้เชื้อเจริญในสภาพไม่มีอากาศ ส่วนอีกหลอดไม่ต้องเททับด้วยพาราฟินเหลว เพื่อให้เชื้อเจริญในสภาพที่มีอากาศ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจผลจนครบ 7 วัน จุลินทรีย์ที่เป็นเฟอร์เมนเททีฟสามารถสร้างกรดซึ่งเกิดจากการหมักกลูโคสทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน ในขณะที่จุลินทรีย์ที่เป็นออกซิเดทีฟการสร้างกรดจะเกิดขึ้นได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. การหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ และเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (Homofermentative-heterofermentative differential, HHD) ดัดแปลงจาก Mc Donald, 1987

สูตร

Fructose	2.5	กรัม
KH_2PO_4	2.5	กรัม
Peptone	1.5	กรัม
Casamino acid	3.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
Tween 80	1.0	มิลลิลิตร
Bromocresol green	0.004	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

pH 7.0

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน เติม bromocresal green เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์(สารละลาย bromocresol green เตรียมโดยใช้ bromocresol green 0.1 กรัม มาละลายใน 0.01 N NaOH 14.3 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา)นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการ

เพาะเชื้อลงบนอาหารแข็ง HHD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าโคโลนีของเชื้อมีสีเขียวแสดงว่าเป็นพวก homofermentative แต่ถ้าโคโลนีเป็นสีขาวจัดเป็นพวก heterofermentative

8. ความสามารถในการใช้สารคาร์โบไฮเดรตบางชนิด

สูตร

อาหารเหลว MRS ที่ไม่มีน้ำตาลกลูโคส แต่ใช้น้ำตาลที่ทดสอบแทนได้แก่ น้ำตาลอะราบิโนส (Arabinose) ไซโลส (Xylose) เมลลิไบโอส (Melibiose) แรฟฟิโนส (Raffinose) แรมโนส (Ramnose) เมลลิไซโตส (Melezitose) ซอบิทอล (Sorbito) แล็กโทส (Lactose) เซลโลไบโอส (Cellobiose) มอลโตส (Maltose) และซูโครส (Sucrose) ในปริมาณร้อยละ 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดที่ต้องการทดสอบ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลทุกวันจนครบ 7 วัน ผลบวกแสดงโดยเชื้อที่มีการเจริญและเปลี่ยนสีของอาหารจากเขียวเป็นสีเหลือง

9. การสร้างเดกซ์แทรน (Garvie, 1960)

อาหาร sucrose agar

สูตร

K_2HPO_4	5.0	กรัม
Triammonium citrate	5.0	กรัม
Tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Sucrose	50.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.0

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มให้วุ้นละลาย และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการ

เลี้ยงเชื้อในอาหาร sucrose agar โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อแทงลงในหลอดอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1-14 วัน ผลบวกแสดงโดยเชื้อที่เจริญขึ้นมาจะสร้างเมือกบนอาหารทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10. การสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน

สูตร

Standard plate count agar	1.0	ลิตร
Casein	10.0	กรัม

ละลายนมผงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และฆ่าเชื้ออาหาร standard plate count agar ด้วยหม้อนึ่งอัดไอเช่นเดียวกัน

วิธีการ

ผสมสารละลายนมผงที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหาร standard plate count agar ที่หลอมเหลวเขย่าให้เข้ากันเทลงในจานเพาะเชื้อ เพาะเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลากลงบนอาหารเป็นเส้นตรง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนจะย่อย casein เห็นเป็นบริเวณใส

11. การเจริญใน 10 % เอทธานอล

สูตร

Nutrient broth	100.0	มิลลิลิตร
Ethanol 10%	10.0	มิลลิลิตร
Bromocresol green	0.004	กรัม

ผสมเอทธานอลลงในอาหาร nutrient broth เติม bromocresal green เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ (สารละลาย bromocresol green เตรียมโดยใช้ bromocresol green 0.1 กรัม มาละลายใน 0.01 N NaOH 14.3 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา) นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการ

เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหาร nutrient broth ที่มีเอทธานอลร้อยละ 10 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลบวกแสดงโดยเชื้อที่มีการเจริญและเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีเขียวเป็นสีเหลือง

12. การเจริญที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.2, 4.8, 7.5, 8.5 และ 9.6

สูตร

อาหารเหลว MRS	100	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 4.2, 4.8, 7.5 และ 8.5 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญของเชื้อจากความขุ่นข้างหลอด

13. การเจริญที่อุณหภูมิ 35, 40 และ 50 องศาเซลเซียส

สารเคมี

อาหารเหลว MRS	100.0	มิลลิลิตร
Bromocresol green	0.004	กรัม

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันเติม bromocresal green เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์(สารละลาย bromocresol green เตรียมโดยใช้ bromocresol green 0.1 กรัม มาละลายใน 0.01 N NaOH 14.3 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา) นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 35, 40 และ 50 องศาเซลเซียส ใน water bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิได้ ผลบวกแสดงโดยเชื้อมีการเจริญและเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีเขียวเป็นสีเหลือง

14. การเจริญที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl ร้อยละ 4, 6.5 และ 18

สารเคมี

อาหารเหลว MRS	100.0	มิลลิลิตร
เกลือ NaCl	4, 6.5 และ 18	กรัม
Bromocresol green	0.004	กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันเติม bromocresal green เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์(สารละลาย bromocresol green เตรียมโดยใช้ bromocresol green 0.1 กรัม มาละลายใน 0.01 N NaOH 14.3 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา) นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่มีเกลือ NaCl ในปริมาณร้อยละ 4, 6.5 และ 18 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ผลบวกแสดงโดยเชื้อมีการเจริญและเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีเขียวเป็นสีเหลือง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี

1.การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยวิธีของ AOAC. (1984)

วิธีการ

1.1ชั่งตัวอย่างแหนมเห็ดหนัก 10.0 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 200 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาณ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.2 วัดความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH meter

2. การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติค โดยวิธีของ AOAC. (1984)

สารเคมี

2.1 สารละลายฟีนอฟทาลีน (phenolphthalein solution)

ชั่ง phenolphthalein 1.00 กรัม ละลายในเอทธานอล 95 % 60 มิลลิลิตร โดยปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2.2 สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟธาเลต (KHP) 0.1000 M

ชั่ง KHP 2.0526 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

2.3 สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน

ชั่งสาร NaOH 1.00 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 250 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐาน KHP ใส่ลงใน flask ขนาด 150 มิลลิลิตร ขวดละ 10 มิลลิลิตร หยดสารละลาย phenolphthalein 2-3 หนด ไตเตรทกับสานละลาย NaOH จนถึงจุดยุติ สังเกตได้จากสีของสารละลายจากไม่มีสีเปลี่ยนเป็นสีชมพู ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำปริมาตรเฉลี่ยของสารละลาย NaOH ที่ใช้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย NaOH

วิธีการ

ปิเปตสารละลายใสของตัวอย่างที่ผ่านการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง แล้วจำนวน 10 มิลลิลิตร มาไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ที่ผ่านการ Standardized กับสารละลายมาตรฐาน KHP โดยสารละลาย phenolphthalein เป็นอินดิเคเตอร์จนได้จุดยุติเป็นสีชมพูอ่อน ๆ อย่างถาวร คำนวณหาปริมาณร้อยละของความเป็นกรดทั้งหมดโดยคิดเทียบกับกรดแลคติค ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณ

ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติค = $\frac{(V)(N)(MW)(100)}{(1000)(U)}$

โดยกำหนดให้

V = ปริมาตรโดยเฉลี่ยของสารละลายด่างมาตรฐานที่ใช้ในการไตไตรทจนถึงจุดยุติ (มิลลิลิตร)

N = Normality ของสารละลายด่างมาตรฐาน NaOH (นอร์มอล)

U = ปริมาณของสารละลายตัวอย่างที่นำมาไตเตรท (มิลลิลิตร)

MW = น้ำหนักโมเลกุลของกรดแลคติค ซึ่งมีค่าเท่ากับ 90.08

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ง

แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ชื่อ.....

วันที่.....เวลา.....

รหัสตัวอย่าง.....

กรุณาประเมินตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์แหนมเห็ด โดยบ้วนปากด้วยน้ำที่จัดให้และชิมตัวอย่าง เพื่อประเมินลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture) และประเมินกลิ่นรส (Flavor) ให้คะแนนโดยขีดเส้นตั้งฉากกับเส้นแนวนอน (ความยาว 10 เซนติเมตร) ตามที่ท่านเห็นว่าเหมาะสม

ขอบคุณ

<u>เนื้อสัมผัส</u> (Texture)

ความแน่นเนื้อ (Firmness) _____

ร่วน แน่นมาก

การยึดเกาะ (Cohesiveness) _____

น้อย มาก

<u>รสชาติ</u> (Flavor)

รสเค็ม (Salty) _____

ไม่เค็ม เค็มมาก

รสเปรี้ยว (Sour) _____

ไม่เปรี้ยว เปรี้ยวมาก

<u>กลิ่นแหนมเห็ด</u> (Aroma) _____

น้อย มาก

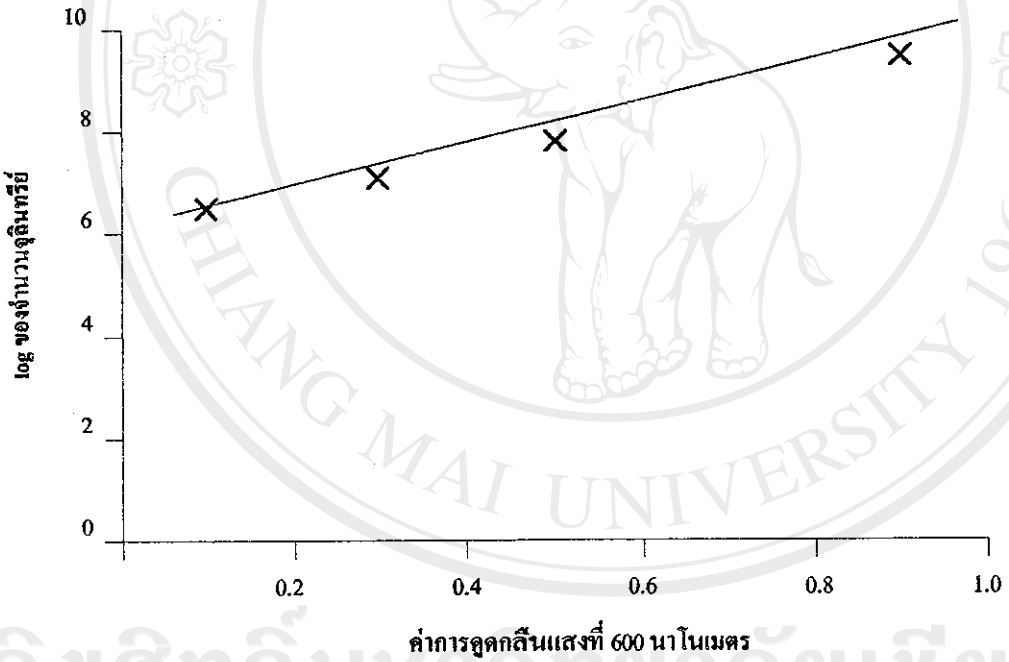
<u>การยอมรับรวม</u> _____

(overall acceptability) ไม่ยอมรับมากที่สุด ยอมรับมาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

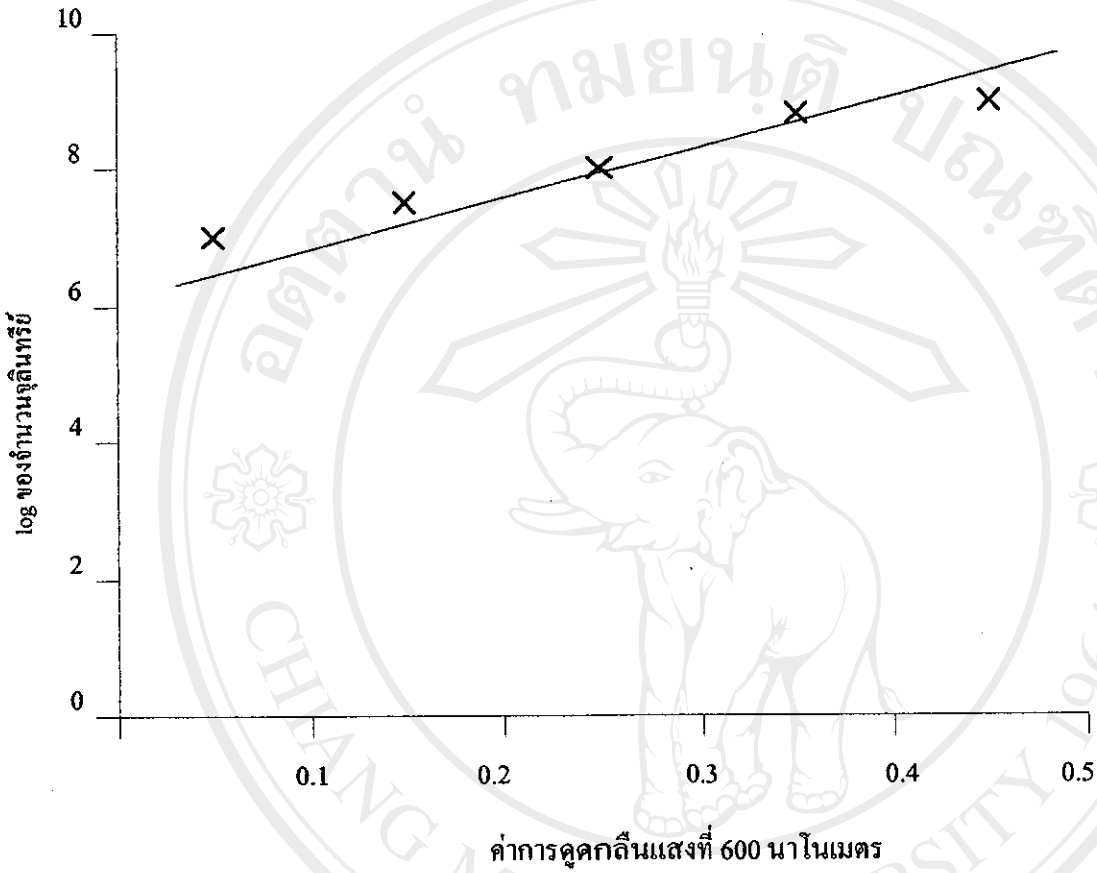
ภาคผนวก จ

กราฟมาตราฐานของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย



รูป จ-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร กับ log ของจำนวนเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ที่ได้จากเทคนิค Standard plate count

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป จ-2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร กับ log ของจำนวนเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* ที่ได้จากเทคนิค Standard plate count

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ฉ

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตาราง ฉ-1 ความแปรปรวนของคะแนนการยอมรับคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนมเห็ดด้วยเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

คุณลักษณะ	SV	df	SS	MS	F
ความแน่นเนื้อ	ตัวอย่างทดสอบ	3	0.032	0.011	0.025
	ผู้ทดสอบชิม	5	0.009	0.002	0.635
	Error	15	0.039	0.003	
	Total	23	0.080	0.003	
การยึดเกาะ	ตัวอย่างทดสอบ	3	0.074	0.025	0.007
	ผู้ทดสอบชิม	5	0.014	0.003	0.637
	Error	15	0.062	0.004	
	Total	23	0.150	0.007	
ความเค็ม	ตัวอย่างทดสอบ	3	0.015	0.005	0.715
	ผู้ทดสอบชิม	5	0.075	0.015	0.284
	Error	15	0.162	0.011	
	Total	23	0.252	0.011	
ความเปรี้ยว	ตัวอย่างทดสอบ	3	0.615	0.205	0.000
	ผู้ทดสอบชิม	5	0.131	0.026	0.001
	Error	15	0.048	0.003	
	Total	23	0.749	0.035	
กลิ่นแหนมเห็ด	ตัวอย่างทดสอบ	3	0.293	0.098	0.000
	ผู้ทดสอบชิม	5	0.032	0.006	0.267
	Error	15	0.066	0.004	
	Total	23	0.391	0.017	
ความชอบรวม	ตัวอย่างทดสอบ	3	1.183	0.394	0.000
	ผู้ทดสอบชิม	5	0.017	0.003	0.570
	Error	15	0.063	0.004	
	Total	23	1.263	0.055	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ช

รูปผลิตภัณฑ์แหนมเห็ด

รูป ช-1 แหนมเห็ดบรรจุในถุงพลาสติก

รูป ช-2 แหนมเห็ดบรรจุในใบตองกล้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวนงลักษณ์ สายเทพ
วัน เดือน ปี เกิด	25 กรกฎาคม 2520
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนบุญวาทย์วิทยาลัย ลำปาง ปีการศึกษา 2539
	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2543
ประสบการณ์	เสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์ (PR-14) "Chemical and Microbiological Aspects of Nham-het" ในการประชุม International Symposium on Bio-Trace Elements 2002 ณ. ประเทศญี่ปุ่น 28-31 ตุลาคม 2545
	เสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์ (PD01-14a) "Characterization and Distribution of Lactic Acid Bacteria from Traditional Nham-het Fermentation" ในการประชุม The First International Congress on Bio-Nanointerface ณ. ประเทศญี่ปุ่น 19-24 พฤษภาคม 2546

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved