บทปฏิบัติการที่ 3
EXAMINATION OF CARBOHYDRATE PRODUCTS

Carbohydrate products ที่ใช้ในการทดลองบทนี้ได้แก่แป้งและน้ำตาลซึ่งปกติมักจะมี spore ของพวก thermophile และจุลินทรีย์ต่าง ๆ มากมายหลายชนิด เช่น *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Torulopsis* sp., *Monilia* sp., และ *Bacillus* sp. เป็นต้นเมื่อแป้งและน้ำตาลมีความชื้นต่ำ จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในแป้งและน้ำตาลจะไม่ทำให้แป้งและน้ำตาลเสีย แต่เมื่อแป้งและน้ำตาลมีความชื้นสูงจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่มีอยู่ก็จะทำให้แป้งและน้ำตาลเสียได้ นอกจากนั้น จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในแป้งและน้ำตาลเป็นตัวช่วยบอกถึงคุณภาพของแป้งและน้ำตาลในสภาพที่เป็นวัตถุดิบ และเป็นตัวการที่มาเกี่ยวข้องเมื่อนำแป้งและน้ำตาลไปทำผลิตภัณฑ์อย่างอื่น National Canners Association Research Laboratories ได้วาง standard ของแป้งและน้ำตาลที่จะนำมาใช้สำหรับการผลิตอาหารกระป๋องดังนี้

standard

แป้งและน้ำตาลที่เป็นตัวอย่างนำมาตรวจมีอยู่อย่างละ 5 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 10 กรัม และเมื่อทำการตรวจแล้วจะต้องได้ผลดังต่อไปนี้จึงจะถือว่านำไปใช้ได้

1. total thermophilic spore count : ในแต่ละตัวอย่างจะต้องมี spore ของ thermophile อยู่ไม่เกิน 150 spore และเมื่อหาค่าเฉลี่ยใน 5 ตัวอย่าง ที่ตรวจ จะต้องมี spore ของ thermophile อยู่ไม่เกิน 125 spore

2. flat sour spores : ในแต่ละตัวอย่างไม่ควรมี spore ของพวก flat sour อยู่มากกว่า 75 spore และเมื่อหาค่าเฉลี่ยใน 5 ตัวอย่างที่ตรวจไม่ควรมี spore ของพวก flat sour อยู่มากกว่า 50 spore

3. thermophilic anaerobic spores : ในแต่ละตัวอย่างจะต้องได้ผล positive ไม่มากกว่า 4 หลอด (tube) และเมื่อใช้ 5 ตัวอย่างมาตรวจจะต้องได้ผล positive ไม่มากกว่า 3 ตัวอย่าง (tube) (60 percent)

4. sulfide spoilage spores : ในแต่ละตัวอย่างจะต้องมี spore ไม่มากกว่า 5 spore และเมื่อใช้ 5 ตัวอย่างมาตรวจจะต้องได้ผล positive ไม่มากกว่า 2 ตัวอย่าง (tube) (40 percent)

วัสดุและอุปกรณ์

1. แป้ง
2. น้ำตาล
3. น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 99 มิลลิลิตร และมีทรายที่ปราศจากเชื้ออยู่ 10 กรัม
4. น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 99 มิลลิลิตร
5. น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 4.5 มิลลิลิตร
6. dextrose tryptone bromcresol purple agar
7. potato dextrose agar
8. plain nutrient agar หรือ agar ที่มีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์
9. จานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ
10. pipette ที่ปราศจากเชื้อ
11. หลอด (test tube) ที่ปราศจากเชื้อ

วิธีทำ **Detection of mesophiles**

แป้ง

ชั่งแป้ง 11 กรัม ใส่ลงในขวดซึ่งมีน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้ออยู่ 99 มิลลิลิตร และมีทรายที่ปราศจากเชื้ออยู่ 10 กรัม เขย่าอย่างแรงประมาณ 2 นาที วางไว้ประมาณ 2–3 นาที เพื่อให้พวก particle หนัก ๆ ตกตะกอน แล้วทำ dilution 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} แล้วนำมาตรวจดังต่อไปนี้

1. **total count :** pipette 1 มิลลิลิตร จากแต่ละ dilution ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อทำ dilution ละ 2 จานก่อน pipette เขย่า dilution ต่าง ๆ อย่างแรงประมาณ 2 นาที วางไว้ประมาณ 2–3 นาที เพื่อให้พวก particle หนัก ๆ ตกตะกอน ริน dextrose tryptone bromcresol purple agar ที่ยังเหลวอยู่ลงไป เขย่าให้น้ำละลายแป้งและอาหารเลี้ยงเชื้อปนกันทั่วดี ระวังอย่าให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระฉอกไปที่ข้าง ๆ หรือที่ฝา วางทิ้งไว้จนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อเย็นและแข็งตัวแล้วจึงจับขึ้นวางกลับเอาด้านฝาลงล่างนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 30–32° ซ. 2–3 วัน หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 วัน แล้วนำออกมาตรวจดูเลือกจานที่มีจำนวนโคโลนีขึ้น 30–300 โคโลนี นับจำนวนโคโลนีทั้งหมด โคโลนีที่ให้ acid ซึ่งเป็นพวก flat sour จะมีลักษณะโคโลนีกลม ทึบแสงตรงกลางมีจุดสีดำและมีวงกลมสีเหลืองล้อมรอบโคโลนี รายงานผลแสดงถึงจำนวนโคโลนีที่มีอยู่ในแป้ง 1 กรัม

2. **total anaerobes :** pipette 1 มิลลิลิตร จากแต่ละ dilution ใส่ลงในหลอดที่มี dextrose tryptone bromcresol purple agar ที่ยังเหลวอยู่ (ประมาณ 45° ซ.) ทำ dilution ละ 2 หลอด เขย่า

ให้น้ำละลายแป้งและอาหารเลี้ยงเชื้อปนกันทั่วดี วางทิ้งไว้จนกระทั่งวุ้นเย็นและแข็งตัวริน agar ที่มีความเข้มข้น 3% และทำให้ปราศจากเชื้อแล้วลงไปทับให้หนาประมาณ 0.5 นิ้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30–32° ซ. 2–3 วัน แล้วนำออกมาตรวจดู รายงานผลแสดงถึงจำนวน anaerobic bacteria ที่มีอยู่ในแป้ง 1 กรัม

3. **counting of bacterial spore (aerobe)** : pipette 10 มิลลิลิตร จาก dilution 1:10 ใส่ลงในหลอดที่ปราศจากเชื้อนำไปแช่ใน water bath ซึ่งมีอุณหภูมิ 80° ซ. 10 นาที ทำให้เย็นทันที ฆ่าจุลินทรีย์ที่อาจติดอยู่ตรงส่วนบนของหลอด pipette 1 มิลลิลิตรใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ ริน dextrose tryptone bromcresol purple agar ที่ยังเหลวอยู่ลงไป เขย่าให้น้ำละลายแป้งและอาหารเลี้ยงเชื้อปนกันดี วางทิ้งไว้จนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อเย็นและแข็งตัวแล้ว จึงจับขึ้นวางกลับเอาด้านฝาลงล่าง นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 30–32° ซ. 2–3 วันหรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 วัน นำออกมาตรวจดูรายงานผลแสดงถึง bacterial spore ที่มีอยู่ในแป้ง 1 กรัม

4. **yeasts** และ **molds** : ปฏิบัติอย่างเดียวกับที่ได้บรรยายไว้ในการตรวจ total count แต่ใช้ potato dextrose agar แทน dextrose tryptone bromcresol purple agar และเก็บจานเพาะเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30–32° ซ. ประมาณ 5 วัน

น้ำตาล

ชั่งน้ำตาล 11 กรัม ใส่ลงในขวดซึ่งมีน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้ออยู่ 99 มิลลิลิตร เขย่าทำ dilution 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} แล้วนำมาตรวจหา total count, total anaerobic bacteria, counting of bacterial spore (aerobe), yeasts and molds ด้วยวิธีการต่าง ๆ อย่างเดียวกับที่ได้บรรยายไว้ในการตรวจแป้ง รายงานผลแสดงถึงจำนวนจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำตาล 1 กรัม

ผลการทดลอง

	จำนวนจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหาร 1 กรัม			
	total count	total anaerobes	bacterial spores	yeasts & molds
Control				
แป้ง				
น้ำตาล				

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง