

รายงานการปฏิบัติงานสหกิจศึกษา

เรื่อง

การทำความสะอาดในโรงงานอุตสาหกรรมและการวิเคราะห์แป้ง

Industrial Cleaning and Flour Analysis



ปฏิบัติงาน ณ

บริษัท เยนเนอรัล ฟู้ด โปรดักส์ จำกัด

สถานที่ตั้ง 89 หมู่ 3 ถนนสีคิ้ว-ชัยภูมิ ตำบลวังโรงใหญ่

อำเภอสีคิ้ว จังหวัดนครราชสีมา

คำนำ

รายงานฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงวิธีการทำความสะอาดในโรงงาน และวิธีการวิเคราะห์ข่าวและแบ่งทางด้านจุลชีววิทยาและเคมีเพื่อเป็นข้อมูลในการจัดตั้งห้องปฏิบัติการทางผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อโรงงานในการนำไปพิจารณาปรับปรุงโรงงานต่อไป และหากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำต้องขอภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

จัดทำ ณ กรุงเทพมหานคร

(นางสาวอัจฉรา พานทอง)

9 ธันวาคม 2542



จดหมายนำส่ง

วันที่ 10 ธันวาคม พ.ศ. 2542

เรื่อง ขอส่งรายงานการปฏิบัติงานสหกิจศึกษา

เรียน อาจารย์ที่ปรึกษาสหกิจศึกษา สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร อ.ดร. ปิยวรรณ กาสลัก

ตามที่ข้าพเจ้า นางสาวอัจฉรา พานทอง นักศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้ไปปฏิบัติงานสหกิจศึกษา(305499) ระหว่างวันที่ 31 สิงหาคม 2542 ถึง 9 ธันวาคม 2542 ในตำแหน่งเจ้าหน้าที่ฝ่ายควบคุมคุณภาพ ณ บริษัทเป็นเนอรัล ฟู้ด โปรดักส์ จำกัด และได้รับมอบหมายจาก Job supervisor ให้ทำรายงานเรื่อง การทำความสะอาดในโรงงานอุตสาหกรรมและการวิเคราะห์แป้ง (Industrial Cleaning and Flour Analysis)

บัดนี้ การปฏิบัติงานสหกิจศึกษา ได้สิ้นสุดลงแล้ว ข้าพเจ้าจึงขอส่งรายงานดังกล่าวมาพร้อมนี้ จำนวน 1 เล่ม เพื่อรับค่าปรึกษาต่อไป

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา

ขอแสดงความนับถือ

อัจฉรา พานทอง

(นางสาว อัจฉรา พานทอง)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

กิตติกรรมประกาศ

การที่ข้าพเจ้าได้มาปฏิบัติงานสหกิจศึกษา ณ บริษัท เชนเนอร์ล ฟู้ด โปรดักส์ จำกัด ตั้งแต่วันที่ 31 สิงหาคม 2542 ถึง 9 ธันวาคม 2542 ส่งผลให้ข้าพเจ้าได้รับความรู้และประสบการณ์ต่างๆที่มีค่ามากมาย สำหรับรายงานการสหกิจศึกษานี้สำเร็จลงได้ด้วยดีจากความร่วมมือและสนับสนุนจากหลายฝ่าย ดังนี้

1. คุณภานุพงศ์ กิตติวงษ์วิวัฒน์ ผู้จัดการโรงงาน บริษัทเชนเนอร์ลฟู้ด โปรดักส์ จำกัด ที่เห็นความสำคัญของระบบการศึกษาแบบสหกิจศึกษา และได้ให้โอกาสที่มีคุณค่าต่อข้าพเจ้า

2. คุณศรพร ว่องสาทรกิจ หัวหน้าฝ่ายควบคุมคุณภาพและพัฒนาผลิตภัณฑ์ ซึ่งเป็น Co-op Supervisor

3. คุณลักษณะ วิบูลพรชัย เจ้าหน้าที่ฝ่ายควบคุมคุณภาพ ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการทำรายงาน

ข้าพเจ้าใคร่ขอกราบขอบพระคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่าน ที่มีส่วนสนับสนุนให้รายงานวิชาการนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

อัจฉรา พานทอง

(นางสาวอัจฉรา พานทอง)

ผู้จัดทำรายงาน

9 ธันวาคม 2542



สารบัญเรื่อง

	หน้า
จดหมายนำส่ง	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
ประวัติความเป็นมาของบริษัท	ฉ
โครงสร้างการจัดแบ่งหน่วยงานของบริษัท	ช
แผนการปฏิบัติงาน	ซ
การทำความสะอาดในโรงงานอุตสาหกรรมและการวิเคราะห์แบ่ง	
บทนำ	1
การจำแนกประเภทสิ่งสกปรก	1
ปัจจัยที่มีผลต่อการทำความสะอาด	1
วิธีการทำความสะอาด	3
การทำความสะอาดในสายการผลิตของบริษัทเยนเนอรัลฟู้ด โปรดักส์ จำกัด	7
การวิเคราะห์แบ่งทางจุลชีววิทยา	16
การวิเคราะห์แบ่งทางเคมี	30
สรุปผลการปฏิบัติงาน	37
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก ก	40
ภาคผนวก ข	51
ภาคผนวก ค	55

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงลักษณะของโคโลนีของเชื้อที่เจริญบน Rambach Agar	27
2 แสดงการตรวจ <i>Samonella</i> ที่ให้ผลบวก	29
 ตารางผนวกที่	
1 แสดง MPN Index	51



สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การทำงานของปืนไอน้ำขับเคลื่อนสารละลาย	5
2ก เครื่องล้างแบบ high-pressure, low-volume	8
2ข ท่อฉีดน้ำแรงดันสูงที่มีหัวฉีดด้วยอัตรา 4-10 ลิตร/นาที	9
3 เครื่องเป่าและดูดฝุ่น	11
4 ระบบการเป่าลมเพื่อกำจัดเศษสิ่งสกปรกที่มีน้ำหนักเบา	11
5ก บริเวณวางระบายน้ำแบบปัจจุบัน	12
5ข บริเวณวางระบายน้ำแบบใหม่	12
6 ท่อปล่อยข้าวลงรางสกรู	13
7ก การเตรียมการเจือจางโดยใช้ตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร	16
7ข การเตรียมการเจือจางโดยใช้ตัวอย่าง 11.0 มิลลิลิตร	17
8 ชนิดของการเกิดปฏิกิริยาเมื่อทดสอบ coagulase ของ <i>S. aureus</i>	25
9ก อุปกรณ์การย่อยโปรตีน	32
9ข อุปกรณ์กลั่นหาปริมาณโปรตีน	33
10 อุปกรณ์การวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟด์	35

ประวัติความเป็นมาของบริษัท

บริษัท เทคโนโลยีสู่อนาคต จำกัด ได้เริ่มก่อตั้งเมื่อปีพ.ศ. 2539 และได้เปิดทำการเป็นเชิงพาณิชย์เมื่อปีพ.ศ. 2540 ขณะนั้นเจ้าของบริษัท ตั้งอยู่ที่ 80 หมู่ 3 ต. สีคิ้ว อ. สีคิ้ว จ. นครราชสีมา โดยได้เปิดโรงงานแม่ข่ายเมื่อวันที่ 29 มี.ค. 2541 สาขารวบรวมไปด้วยขนาดสำนักงาน 2 ชั้น และตัวโรงงานติดกับ มีการเดินเครื่องจักรตลอด 24 ชั่วโมง และมีกำลังการผลิตประมาณ 760 แกรมป์ ปัจจุบันมีจำนวนพนักงานทั้งหมด 164 คน แบ่งการทำงานออกเป็น 3กะ คือ กะเช้า ทำงานตั้งแต่เวลา 07.00 – 16.00 น. กะบ่าย ทำงานตั้งแต่เวลา 16.00 – 24.00 น. และกะดึก ทำงานตั้งแต่เวลา 23.00 – 08.00 น. โดยสับเปลี่ยนหมุนเวียนกันกะละ 1 สัปดาห์ และมีวันหยุดคนละ 1 วันต่อสัปดาห์ ส่วนพนักงานทั่วไปทำงานตามปกติ คือทำงานตั้งแต่เวลา 08.00 – 17.00 น. และหยุดวันอาทิตย์

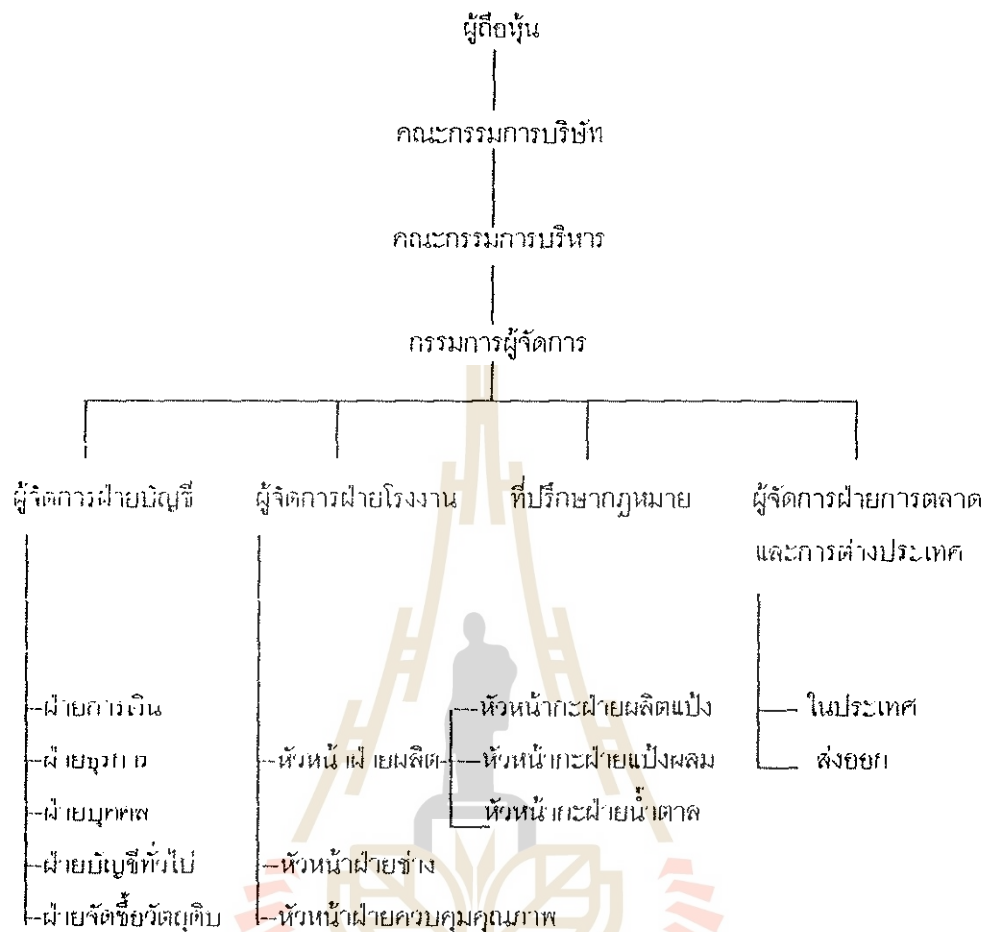
วัตถุประสงค์ของบริษัทที่บริษัทฯ ได้ทำการผลิตได้แก่

1. แป้งข้าวเหนียว
2. แป้งข้าวเจ้า
3. แป้งข้าวเหนียวผสม

ทางบริษัทฯ ได้พัฒนากระบวนการผลิต โดยใช้เทคโนโลยีขั้นสูงและทันสมัย มีการขยายกำลังการผลิตให้มากขึ้น และทางบริษัทฯ ก็ได้พัฒนาแม่พิมพ์ให้เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต พัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ และพัฒนาพนักงานของบริษัทฯ ให้มีความชำนาญในการปฏิบัติงานได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

โครงสร้างการจัดแบ่งหน่วยงานของบริษัท



แผนการปฏิบัติงาน

วันที่	งานที่ปฏิบัติ
31 สิงหาคม 2542	เรียนรู้ขั้นตอนการผลิตแปงในสายการผลิต
1-4 กันยายน 2542	เรียนรู้งานด้านการตรวจสอบคุณภาพแปงในห้องปฏิบัติการ
5 กันยายน 2542	วันหยุด
6-11 กันยายน 2542	ปฏิบัติงานด้านการตรวจสอบคุณภาพแปง, น้ำตาล และข้าวในห้องปฏิบัติการ
12 กันยายน 2542	วันหยุด
13-18 กันยายน 2542	ปฏิบัติงานด้านการตรวจสอบคุณภาพแปง, น้ำตาล และข้าวในห้องปฏิบัติการ
19-21 กันยายน 2542	ปฏิบัติงานด้านการตรวจสอบคุณภาพแปงส่งออกร่วมกับเจ้าหน้าที่ชาวญี่ปุ่น
22 กันยายน 2542	ตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในแปง
23-25 กันยายน 2542	ตรวจวัดสภาพความร้อน แสงและเสียงในโรงงาน
26 กันยายน 2542	วันหยุด
27-29 กันยายน 2542	ตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในแปง ที่มหาวิทยาลัย
30 กันยายน 2542	ปฏิบัติงานด้านการตรวจสอบคุณภาพแปง, น้ำตาล และข้าวในห้องปฏิบัติการ
1-2 ตุลาคม 2542	ปฏิบัติงานด้านการตรวจสอบคุณภาพแปง, น้ำตาล และข้าวในห้องปฏิบัติการ
3 ตุลาคม 2542	วันหยุด
4-8 ตุลาคม 2542	ค้นคว้าข้อมูลการวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา
9-12 ตุลาคม 2542	ปฏิบัติงานด้านการตรวจสอบคุณภาพแปงส่งออกร่วมกับเจ้าหน้าที่ชาวญี่ปุ่น
13-14 ตุลาคม 2542	ตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในแปง
15-16 ตุลาคม 2542	รวบรวมข้อมูลการวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา
17 ตุลาคม 2542	วันหยุด
18-20 ตุลาคม 2542	ตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในแปง ที่มหาวิทยาลัย
21-23 ตุลาคม 2542	ค้นคว้าข้อมูลการทำความสะอาดในโรงงานอุตสาหกรรม
24 ตุลาคม 2542	วันหยุด
25-26 ตุลาคม 2542	ตรวจดูการทำความสะอาดภายในโรงงาน
27 ตุลาคม 2542	รายงาน
28-29 ตุลาคม 2542	ตรวจวิเคราะห์ความหนืดในแปง ที่มหาวิทยาลัย
30 ตุลาคม 2542	ทำรายงานการทำความสะอาดในโรงงาน
31 ตุลาคม 2542	วันหยุด
1-2 พฤศจิกายน 2542	ศึกษาข้อมูลและจัดทำรายงานการทำความสะอาดในโรงงาน
3-5 พฤศจิกายน 2542	ตรวจวิเคราะห์ความหนืดในแปง ที่มหาวิทยาลัย

วันที่	งานที่ปฏิบัติ
6 พฤศจิกายน 2542	รายงานผลการวิเคราะห์ความหนีต
7 พฤศจิกายน 2542	วันหยุด
8-13 พฤศจิกายน 2542	ศึกษาข้อมูลและจัดทำรายงาน
14 พฤศจิกายน 2542	วันหยุด
15-17 พฤศจิกายน 2542	ตรวจวิเคราะห์ความหนีตในแบ่ง ทีมมหาวิทยาลัย
18 พฤศจิกายน 2542	ศึกษาข้อมูลและจัดทำรายงาน
19-21 พฤศจิกายน 2542	ปฏิบัติงานด้านการตรวจสอบคุณภาพแบ่งส่งออกพร้อมกับเจ้าหน้าที่ชาวญี่ปุ่น
22 พฤศจิกายน 2542	ลางาน
23-27 พฤศจิกายน 2542	ศึกษาข้อมูลและจัดทำรายงาน
28 พฤศจิกายน 2542	วันหยุด
29 พฤศจิกายน 2542	เตรียมตัวอย่างแบ่งเพื่อนำไปวิเคราะห์
30 พฤศจิกายน 2542	ตรวจวิเคราะห์ความหนีต และปริมาณอะไมโลสในตัวอย่างแบ่ง ทีมมหาวิทยาลัย
1-2 ธันวาคม 2542	ตรวจวิเคราะห์ความหนีต และปริมาณอะไมโลสในตัวอย่างแบ่ง ทีมมหาวิทยาลัย
3-4 ธันวาคม 2542	จัดทำรายงาน
5-6 ธันวาคม 2542	วันหยุด
7 ธันวาคม 2542	จัดทำรายงาน
8 ธันวาคม 2542	ส่งรายงาน
9 ธันวาคม 2542	รับรายงานคืนและแก้ไขรายงาน
10 ธันวาคม 2542	นำเสนอรายงานต่อ Supervisor

บทนำ

โปรแกรมการทำความสะอาดเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้ธุรกิจประสบความสำเร็จได้ ในโรงงานอาหารนำโปรแกรมการทำความสะอาดมาใช้ 2 ประเภทได้แก่

- (1) โปรแกรมที่ดำเนินการโดยผู้ผลิต
- (2) โปรแกรมที่สัญญาว่าจ้างบริษัทภายนอก

การเลือกใช้โปรแกรมแบบใดขึ้นอยู่กับความพร้อมของโรงงานนั้นๆ สิ่งสำคัญที่ทำให้การทำความสะอาดได้ผลคือ ความเข้าใจในชนิดและธรรมชาติของสิ่งสกปรกที่ต้องการกำจัดออก, ชนิดของเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ต้องการทำความสะอาด, ผลที่ได้รับจากการทำความสะอาด, ความรู้เกี่ยวกับชนิดและคุณสมบัติของสารทำความสะอาด, การตั้งโปรแกรมทำความสะอาดที่ดำเนินงานโดยบุคคลที่มีความรู้ โปรแกรมการทำความสะอาดควรนำมารวมไว้กับโปรแกรมการประเมินอันตรายและควบคุมจุดวิกฤต(HACCP) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของโปรแกรม

ในบางโรงงาน การกำหนดช่วงเวลาทำความสะอาดอาจกระทำเมื่อขาดวัตถุดิบในการผลิต ช่วงเปลี่ยนกะการทำงาน ช่วงสิ้นสุดการทำงานในแต่ละวัน ซึ่งการเลือกเวลาการทำความสะอาดจะพิจารณาจากชนิดของผลิตภัณฑ์ กระบวนการผลิต และจำนวนคณะกรรมการที่รับผิดชอบด้านสุขาภิบาลโรงงาน การทำความสะอาดที่ไม่ดีพอมีผลต่อการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ ซึ่งทำให้เกิดเนื้อมือ การเปลี่ยนสีของสายพาน การเกิดกลิ่นเหม็นหืนและเป็นผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่ดี ดังนั้นจึงต้องมีการสำรวจชนิดของจุลินทรีย์เพื่อระบุบริเวณวิกฤต ซึ่งทำให้กำหนดช่วงเวลา ระยะเวลา ชนิดของสารฆ่าเชื้อได้จากคุณสมบัติของจุลินทรีย์ได้อย่างเหมาะสม การสำรวจชนิดของจุลินทรีย์ควรมีห้องปฏิบัติการของโรงงานนั้นเพื่อความสะดวกและมีวิธีการวิเคราะห์ที่เป็นไปตามมาตรฐาน มีบุคลากรที่มีความรู้และมีประสบการณ์ทางด้านจุลชีววิทยาเพื่อให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องจึงเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้โรงงานผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพได้

การจำแนกประเภทสิ่งสกปรก

ในโรงงานอาหารแต่ละแห่งจะมีสิ่งสกปรกที่เกิดขึ้นแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ทำการผลิต สภาพแวดล้อมในการผลิต วัตถุดิบที่ใช้ สามารถจำแนกสิ่งสกปรกได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. สารอินทรีย์
 - 1.1 ตะกรันน้ำกระด้าง ได้แก่ แคลเซียมคาร์บอเนตและแมกนีเซียมคาร์บอเนต
 - 1.2 คราบจากโลหะ ได้แก่ สนิมและออกไซด์ต่างๆ
 - 1.3 คราบจากด่าง ได้แก่ แผ่นฟิล์มที่เกิดจากการล้างสารทำความสะอาดประเภทด่างออกไม่ดีพอ
2. สารอนินทรีย์
 - 2.1 คราบอาหาร
 - 2.2 บีโตรเลียม ได้แก่ น้ำมันหล่อลื่น จาระบี
 - 2.3 ไมไซบีโตรเลียม ได้แก่ ไขมันพืชและสัตว์

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการทำความสะอาด

1. ธรรมชาติของสิ่งสกปรก
2. ความเข้มข้นของสารทำความสะอาดที่ใช้
3. อุณหภูมิของสารละลาย

4. เวลาที่สิ่งสกปรกสัมผัสกับสารละลายทำความสะอาด
5. การเลือกสารทำความสะอาดที่เหมาะสม
6. วิธีการใช้สารละลายทำความสะอาด
7. แรงขัดหรือการกวาด

ปัจจัยต่างๆข้างบนนี้คือปัจจัยที่พบเสมอเมื่อเกี่ยวข้องกับอัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมี การเพิ่มหรือลดปัจจัยหนึ่งใด โดยทั่วไปย่อมมีผลกระทบต่อปัจจัยตัวอื่น

➤ ธรรมชาติของสิ่งสกปรก

สิ่งสกปรกแต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกัน สามารถแบ่งได้เป็น สิ่งสกปรกที่ละลายในน้ำ สิ่งสกปรกที่ละลายในสารทำความสะอาดและสิ่งสกปรกที่ไม่ละลายในสารทำความสะอาด เมื่อพิจารณาคุณสมบัติของสิ่งสกปรกแล้วทำให้สามารถเลือกสารทำความสะอาดที่เหมาะสมได้ ระยะเวลาที่ใช้

➤ ความเข้มข้น

ต้องมีสารทำความสะอาดอยู่ในสารละลายด้วยปริมาณอย่างต่ำที่สุดปริมาณหนึ่ง ซึ่งช่วยให้งานทำความสะอาดได้ผลน่าพึงพอใจ เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารทำความสะอาดสูงขึ้นการกำจัดคราบอาหารก็ทำได้รวดเร็วขึ้นกรณีนี้อาจมีประโยชน์สำหรับโรงงานที่ไม่มีความร้อนให้ใช้ แต่สารละลายที่เข้มข้นมากเกินไปอาจไม่ใช่เรื่องประหยัดสำหรับบางอุตสาหกรรม โดยทั่วไปผลที่ได้ในขั้นสุดท้ายอาจคุ้มกับค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้น

➤ อุณหภูมิ

ความร้อนทำให้พลังทำความสะอาดของสารละลายทำความสะอาดสูงขึ้น เนื่องจากสารทำความสะอาดใช้น้อยลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ค่าใช้จ่ายสำหรับสารทำความสะอาดจึงประหยัดไปได้อย่างมากสาธิต งานทำความสะอาดทำได้เร็วขึ้นที่อุณหภูมิสูงแม้แต่กับสารละลายที่มีกำลังอ่อนกว่า โรงงานหลายประเภทมีไอน้ำพอกที่จะนำมาใช้ได้โดยตรงกับสารละลายทำความสะอาดเข้มข้นสำหรับการทำความสะอาดด้วยสารทำความสะอาดแบบใช้น้ำ หรือเดินท่อไอน้ำผ่านลงไปในถังสารละลายสารทำความสะอาด บางแห่งอาจใช้เตาก๊าซสำหรับให้ความร้อนโดยสะดวก

➤ ระยะเวลาสัมผัสกับสารละลายทำความสะอาด

ระยะเวลาการทำความสะอาดเป็นฟังก์ชันของความเข้มข้นของสารทำความสะอาดที่ใช้ และฟังก์ชันของอุณหภูมิของสารละลาย ธรรมชาติของสิ่งสกปรกที่ต้องการกำจัดก็มีความสำคัญด้วยเช่นกัน ในบางกรณีมีความจำเป็นที่ต้องแช่ไว้นานๆ แต่บางอย่างต้องการสัมผัสกับสารละลายทำความสะอาดที่ได้รับการปรุงแต่งมาอย่างเหมาะสมเพียงระยะเวลาสั้นๆ ก็เพียงพอแล้ว

➤ การเลือกสารทำความสะอาดที่เหมาะสม

สารทำความสะอาดที่ใช้ต้องถูกประเภท การเพิ่มความเข้มข้น เพิ่มอุณหภูมิหรือการแช่ไว้นานๆในสารละลายอาจไม่ช่วยให้ได้ผลตามประสงค์ นอกเสียจากจะใช้สารทำความสะอาดที่เฉพาะกับงาน

➤ วิธีการใช้สารละลายทำความสะอาด

วิธีการเป็นตัวจำกัดระยะเวลาช่วงที่สารละลายทำความสะอาดกระทำหน้าที่ของมันต่อสิ่งสกปรก

➤ การกวาดหรือแรงขัด

การกวาดหรือการใช้แรงขัดเป็นการช่วยเพิ่มการสัมผัสระหว่างสารทำความสะอาดกับสิ่งสกปรก จึงลดเวลาการทำความสะอาดลงได้

วิธีการทำความสะอาด

แบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ

1. การทำความสะอาดแบบแห้ง(Dry cleaning)
2. การทำความสะอาดแบบเปียก(Wet cleaning)
3. การทำความสะอาดแบบผสม(Complex system)

➤ การทำความสะอาดแบบแห้ง

ใช้ในกรณีที่ส่วนผสมหรือผลิตภัณฑ์เป็นสารซึ่งดูดความชื้นได้ง่ายหรือวัตถุดิบที่ดูดความชื้นแล้วจะเกาะตัวเป็นก้อน ล้างออกได้ยาก การทำความสะอาดแบบแห้งจะใช้วิธีการ ได้แก่ ปัด กวาด เช็ด ถู ดุด โดยต้องแยกส่วนที่ทำความสะอาดแบบเปียกออกแล้วจึงทำความสะอาดแบบแห้ง วิธีที่มีประสิทธิภาพคือ การดูดด้วยสูญญากาศ ซึ่งช่วยอำนวยความสะดวกในการทำทำความสะอาดได้มาก และยังป้องกันสิ่งสกปรกไม่ให้กลับมาเกาะติดพื้นผิวที่ทำความสะอาดแล้วได้อีก แต่การทำความสะอาดแบบแห้งมักมีปัญหาเรื่องเชื้อจุลินทรีย์ จึงแนะนำให้ใช้แอลกอฮอล์ฆ่าเชื้อและปล่อยให้ระเหยก่อนที่จะใช้อุปกรณ์นั้น

➤ การทำความสะอาดแบบเปียก

แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

1. การล้างแบบ clean out of place (COP)
2. การล้างแบบ clean in place (CIP)

• Clean out of place

การทำความสะอาดด้วยวิธีนี้ ต้องทำการเคลื่อนย้ายอุปกรณ์ เปิดอุปกรณ์เพื่อถอดอุปกรณ์ภายในออกมาล้างและง่ายต่อการทำความสะอาด เก็บเศษอาหารที่ตกค้างภายในเครื่องออก แล้วล้างด้วยสารทำความสะอาด ใช้แรงกลเข้ามาช่วยในการทำทำความสะอาด ล้างสารทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาด แล้วฆ่าเชื้อ

• Clean in place

อุปกรณ์ต้องถูกออกแบบเพื่อการทำความสะอาดด้วยวิธีนี้ หลังจากปล่อยผลิตภัณฑ์ออกหมดแล้ว ทำการ pre-rinse ไล่เศษอาหารออกก่อนและใช้น้ำยาทำความสะอาดในระยะเวลาที่กำหนด ล้างออกด้วยน้ำสะอาด วนด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อและทำการล้างน้ำสะอาดอีกครั้ง

➤ การทำความสะอาดแบบผสม

วิธีนี้จะผสมระหว่าง COP และ CIP

วิธีการทำความสะอาดโดยใช้สารละลายทำความสะอาด

1. การทำความสะอาดโดยใช้แรงงาน

วิธีการทำความสะอาดโดยใช้แรงงานเป็นวิธีรวดเร็วแต่ก็ล้าสมัยสำหรับงานทำความสะอาด นิยมใช้กันอยู่สำหรับโรงงานขนาดเล็ก การทำความสะอาดแบบนี้ประการแรกต้องใช้สารทำความสะอาดที่ไม่มีผลรุนแรงและไม่ทำให้ผิวหนังคนงานระคายเคือง นอกจากนี้ควรปลอดภัยต่อการใช้กับเครื่องมือและต่อพื้นผิวที่เคลือบสีด้วย สารทำความสะอาดที่เป็นส่วนผสมของด่างอ่อนๆรวมกับสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสมและสารจับไอออนของโลหะในน้ำที่มีฤทธิ์เป็นด่างอ่อน มักมีกำลังทำความสะอาดไม่สูงนัก แต่การนำมาใช้ในการทำความสะอาดด้วยแรงงานก็ได้ผลเสมอ เนื่องจากสารทำความสะอาดพวกนี้โดยทั่วไปใช้เพียงครั้งเดียวแล้วก็ทิ้งไปจึงควรใช้อย่างประหยัด

วิธีการใช้สารทำความสะอาดชนิดอ่อนเหล่านี้ปกติจะใช้ตามวิธีใดวิธีหนึ่งดังต่อไปนี้

1. แช่ทิ้งไว้หรือฟอกถู
2. ฟอกถูหรือล้างออกด้วยน้ำ
3. ล้างออกด้วยน้ำ

น้ำที่ใช้ควรมีคุณภาพดีเสมอ การใช้สารทำความสะอาดจำเป็นต้องปลอดภัยต่อมือของผู้ใช้เป็นข้อจำกัดต่อการสร้างสูตรผสมเป็นอย่างยิ่ง สารทำความสะอาดประเภทนี้จึงไม่มีประโยชน์มากนักเมื่อใช้กับสิ่งสกปรกที่กำจัดยาก เนื่องจากโดยปกติสารทำความสะอาดเหล่านี้มักมีสารลดแรงตึงผิวอยู่จำนวนมาก ดังนั้นจึงไม่สามารถนำไปใช้กับการทำงานอย่างใดที่มีการกวนอย่างแรง เพราะสมบัตินี้จะทำให้เกิดฟองอย่างมากมาสำหรับการฉีดดูแลที่ไม่มีคำแนะนำให้ใช้เลย เพราะมีผลต่อพื้นผิวโลหะแต่บางครั้งก็จำเป็นต้องทำกับพื้นผิวบางอย่างบ้างโดยการใช้แผ่นถู

2. การทำความสะอาดโดยใช้เครื่องจักรกล

วิธีนี้มีความยืดหยุ่นขึ้น สามารถใช้สารละลายทำความสะอาดที่รุนแรงและอุณหภูมิสูงขึ้นกว่าพวกที่ใช้ในงานทำความสะอาดด้วยมือเป็นอย่างมาก มีความเป็นไปได้ในการช่วยให้สารละลายทำความสะอาดพื้นที่กว้างขวางพอสมควรได้อย่างทั่วถึงภายในเวลาสั้นๆ องค์ประกอบเหล่านี้มีสารลดแรงตึงผิวอยู่ไม่มากซึ่งเพียงพอสำหรับทำให้แรงตึงผิวลดลง แต่ไม่มากจนทำให้เกิดฟองขึ้นอย่างมากมา สารลดแรงตึงผิวที่มีความเข้มข้นสูงๆ ไม่มีความจำเป็น การผสมต่างชนิดต่างๆ อย่างเหมาะสมให้ประสิทธิภาพสูงกว่า วิธีการใช้งานสารละลายทำความสะอาดโดยใช้เครื่องจักรกลมีอยู่หลายวิธี สารทำความสะอาดที่ใช้ก็ขึ้นอยู่กับว่าโรงงานมีสิ่งอำนวยความสะดวกอะไรอยู่บ้าง สิ่งที่อยู่อาจเป็นเครื่องล้างแบบฉีดพ่น ตั้งแต่ เครื่องทำความสะอาดด้วยไอน้ำหรือเครื่องฉีดพ่นร้อน

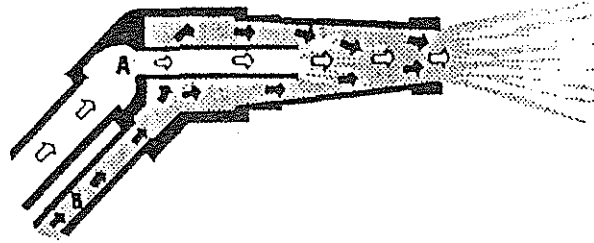
2.1 การล้างแบบฉีดพ่น

ในเครื่องล้างแบบฉีดพ่นปกติทั่วไป วัตถุแบนๆ หรือวัตถุเล็กๆ ถูกพาไปตามสายพานที่เดินอย่างต่อเนื่อง ผ่านการฉีดพ่นเป็นชุดๆ ซึ่งจะปล่อยสารละลายทำความสะอาด ณ อุณหภูมิหนึ่งในช่วงเวลาหนึ่ง ตามด้วยการล้างคราบสกปรกที่เกาะติดอย่างหลวมๆ และสารละลายทำความสะอาดออกด้วยน้ำ

สารทำความสะอาดที่นำมาใช้ในงานนี้ต้องให้ผลรุนแรงกว่าพวกที่ใช้ในการทำความสะอาดด้วยมือ เพราะเวลาที่คราบสกปรกติดกับกับสารละลายทำความสะอาดสัมผัสกันเป็นระยะสั้นๆ การใช้สารทำความสะอาดความเข้มข้นไม่สูงนักก็พอเพียง อุณหภูมิที่สูงขึ้นและแรงฉีดพ่นช่วยขับเคลื่อนให้คราบสกปรกที่เกาะติดอย่างหลวมๆ หลุดออกไปได้มาก สารลดแรงตึงผิวปริมาณไม่มากใช้ร่วมกับส่วนผสมของเกลือที่มีคุณสมบัติเป็นด่างกรใช้มากๆ ทำให้เกิดฟองมากเกินไป อาจไหลล้นจากถังสารละลาย กักขังอากาศไว้ในเครื่องสูบและสร้างความยุ่งยากขึ้นในช่วงการชำระด้วยน้ำ สารลดแรงตึงผิวควรมีคุณสมบัติเกิดฟองน้อย

2.2 การทำความสะอาดด้วยสารทำความสะอาดโดยใช้ไอน้ำ

วิธีทำความสะอาดแบบนี้นิยมใช้กับอุตสาหกรรมอาหารและอื่นๆ ไอน้ำโดยมากมักได้จากหม้อน้ำของโรงงานเอง ถึงแม้ว่าจะสามารถหาเครื่องผลิตไอน้ำได้ก็ตามที่ เครื่องมืออย่างง่ายที่สุดสำหรับการนำไอน้ำที่มีในโรงงานมาใช้ได้แก่ ปืนไอน้ำขับเคลื่อนสารละลาย (solution-lifting steam gun) ซึ่งจะผสมไอน้ำกับสารละลายทำความสะอาดเข้มข้นแล้วพ่นไปที่พื้นผิว แล้วจึงชำระล้างด้วยน้ำ



ภาพที่ 1 การทำงานของปืนไอน้ำขับเคลื่อนสารละลาย : ที่ A ความเร็วของไอน้ำเพิ่มขึ้นแต่ความดันลดลง ทำให้สารทำความสะอาดยิ่งไหลเร็ว ส่วนผสมของสเปรย์ทำความสะอาดควบคุมด้วยการปรับลั่นไอน้ำและลั่นสารละลายบนตัวปืน

วิธีนี้ได้นำหลักการเวนจูรี(Venturi)มาใช้ (ดูภาพที่1) ไอน้ำพุ่งเข้าไปตามช่องแคบในกระบอกปืน ทำให้ความดันลดลง และสร้างสุญญากาศบางส่วนขึ้นมา ทำให้สารละลายถูกดูดเข้าไปหาแล้วผสมเข้ากับไอน้ำ ส่วนผสมของสารละลายทำความสะอาดกับไอน้ำควบคุมด้วยลิ้นบนท่อสารละลายและลิ้นบนท่อไอน้ำ สารละลายเตรียมในถังที่เหมาะสมให้ความเข้มข้นพอสมควร ไม่จำเป็นต้องทำให้ร้อนเพราะอุณหภูมิของมันสูงอยู่แล้วเมื่อผสมกับไอน้ำ ความดันไอน้ำประมาณ 40 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว สูงพอสำหรับการทำความสะอาดทุกวัตถุประสงค์ การล้างด้วยน้ำกระทำโดยการปิดลั่นสารละลาย และใช้ลั่นไอน้ำเพียงอย่างเดียว

สารทำความสะอาดที่เป็นด่างที่ใช้ในงานนี้ควรมีสารลดแรงตึงผิวอยู่บ้างเพื่อช่วยให้กำลังแทรกซึมอย่างรวดเร็วเมื่อใช้ในปริมาณน้อย สารลดแรงตึงผิวยังทำให้ปรากฏผลละลายของฟองปกคลุมไปทั่วพื้นที่ที่พ่นสารละลาย ความร้อนและแรงที่มันปะทะกับพื้นผิวที่ทำความสะอาดย่อมทำให้ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวสูงขึ้น

วิธีการนี้เป็นการกำจัดการปิดกั้นด้วยมือในเกือบทุกกรณี ใช้ก็ง่าย มันบังคับให้สารละลายทำความสะอาดไปตามขอกมุมและรอยปริแยก ได้เครื่องมือไปจนถึงตอนบนๆที่มีมือเอื้อมไปไม่ถึง วิธีนี้มีประโยชน์มากในการพ่นสารละลายไปตามพื้นที่ที่ทำความสะอาดยาก ไม่สามารถเข้าถึงด้วยแปรงหรือว่าใหญ่เกินกว่าจะใช้มือทำความสะอาดอย่างมีประสิทธิภาพได้ เครื่องมืออย่างเช่น สายพานลวด ตาข่าย กล้องเขวน ถาดลวด ดังที่มีรูปหุ่น หิ้งแขวนภาชนะ เครื่องปิดฉลาก เครื่องบรรจุ ไซ้สายพาน สำหรับขนถ่ายผลิตภัณฑ์

2.3 การทำความสะอาดแบบฉีดพ่นร้อน

วิธีการนี้ค่อนข้างคล้ายกับวิธีไอน้ำ-สารทำความสะอาดแต่มีความแตกต่างตรงที่สารละลายขนถ่ายไปในรูปสเปรย์เหลวมากกว่าที่จะเป็นไอ เนื่องจากวิธีไอน้ำ-สารทำความสะอาดทำให้เกิดความชื้นสูงในห้องที่การถ่ายเทอากาศอยู่ในสภาพไม่ดี หรือพื้นที่ที่ฝ้าเพดานต่ำ จนอาจทำให้เชื้อราเจริญเติบโต คนงานก็อาจต่อต้านควันและสเปรย์ต่างๆที่ฟุ้งกระจาย ด้วยเหตุนี้วิธีการทำความสะอาดแบบฉีดพ่นร้อนจึงมีประโยชน์มากกว่าสำหรับการทำความสะอาดในห้องที่การถ่ายเทอากาศอยู่ในสภาพไม่ดี หรือพื้นที่ที่ฝ้าเพดานต่ำ

สารละลายทำความสะอาดที่ฉีดพ่นโดยวิธีนี้อาจใช้สารที่เป็นต่างมากและสามารถฆ่าเชื้อโรคได้ดี นอกจากนี้การทำความสะอาดแบบฉีดพ่นร้อนยังเป็นวิธีการที่ปลอดภัยและง่ายในการใช้สารละลายที่มีปริมาณต่างแก่สูง แต่อาจมีการฟุ้งของสเปรย์และกระเด็นใส่คนงานได้บ้างเล็กน้อยที่ทำให้อาจเกิดการต่อต้านการใช้ขึ้นมา

การทำความสะอาดแบบฉีดพ่นร้อนใช้กับผนัง พื้นโต๊ะยาวทำงาน พื้นผิวหล่อเย็น โซลidayพาน เครื่องสกัดน้ำผลไม้ ในอุตสาหกรรมส้ม ในหม้อต้มเบียร์ ถังเก็บและหม้อต้ม เป็นการกำจัดงานที่ไม่มีผู้โดยยากทำเช่น การปีนลงไปในถังและขัดถูด้วยมือ วิธีการนี้อาจใช้ได้สองทาง: (ก) โดยการปล่อยให้สารละลายไหลลงไปยังถังสกรปรกออกมา หรือ (ข) เป็นวิธีที่ทำให้ถังสกรปรกจากอาหารเปียกชุ่มจนอ่อนพอที่จะล้างออกอย่างได้ผล

โรงงานบางแห่งติดตั้งหัวฉีดไว้ถาวรเพื่อทำความสะอาดคราบมัน สูดฉีดสารทำความสะอาดไปที่ผนังจนเปียกชุ่มทั่วทั้งพื้นผิวแล้วตามด้วยการใช้น้ำร้อนชะล้าง

เครื่องมือกลอีกชนิดหนึ่งได้แก่ เครื่องฉีดพ่นแบบหมุนรอบตัว(rotary sprayer) ซึ่งเพียงแต่อาศัยหลักการของเครื่องฉีดพ่นน้ำสนามหญ้ามาดัดแปลงสำหรับการลำเลียงสารละลายที่ใช้ทำความสะอาด ได้รับการออกแบบให้ใช้กับถังและรถบรรทุกน้ำ โดยเฉพาะ ส่วนที่ทำหน้าที่ฉีดพ่นอาจแขวนติดอยู่กับโคมของถังหรือวางอยู่บนพื้นตัวถัง

เครื่องฉีดพ่นแบบหมุนรอบตัวประกอบด้วยส่วนหัวที่หมุนได้รอบและมีปากกระบอกฉีดติดอยู่จำนวนหนึ่ง เพื่อช่วยลำเลียงสารละลายไปทำความสะอาดพื้นผิวได้ทั่วถึงทุกตารางนิ้ว เครื่องมือนี้ต้องใช้ใช้น้ำอย่างน้อยที่สุด 40 แกลลอนต่อนาทีสำหรับการลำเลียงที่ความดัน 60 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และต้องมีเครื่องสูบล

เครื่องฉีดพ่นแบบหมุนรอบนี้ยังสามารถนำไปใช้กับเครื่องฉีดพ่นไอน้ำได้ด้วย ทำให้สามารถผสมไอน้ำร้อนกับน้ำร้อนเพื่อให้ความร้อนและเพิ่มความดัน สารทำความสะอาดถูกฉีดพ่นไปพร้อมๆกัน โดยฉีดไปที่ถังหรือพื้นผิวของรถบรรทุกน้ำเพียงครั้งเดียวแล้วก็ทิ้งไป โดยทั่วไปสารทำความสะอาดที่ใช้สำหรับการทำความสะอาดแบบฉีดพ่นร้อน เมื่อนำมาใช้แบบนี้ก็ให้ผลเช่นกัน

2.4 การทำความสะอาดแบบหมุนเวียน

วิธีการทำความสะอาดแบบหมุนเวียนหรือการไหลด้วยแรงโน้มถ่วง มีหลักการโดยย่อ คือการทำให้สารละลายทำความสะอาดไหลผ่านอุปกรณ์ทุกชิ้นของระบบผลิตหนึ่งใด การไหลของสารละลายทำความสะอาดจากอุปกรณ์หนึ่งไปสู่อีกอุปกรณ์หนึ่งผ่านท่อแก้วหรือโลหะสแตนเลส ซึ่งใช้ลำเลียงผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลวหรือข้นๆ ระหว่างกระบวนการผลิต ตัวท่อไม่มีการหุ้มยกเว้นแต่ช่วงที่ห่าง เมื่อสารละลายไหลผ่านท่อก็จะทำความสะอาดภายในไปพร้อมกัน ตามปกติสารละลายทำความสะอาดจะถูกสูบจากอุปกรณ์หนึ่งไปสู่อุปกรณ์อื่นๆ หลังจากที่แต่ละอุปกรณ์ได้รับการทำความสะอาดแล้ว ก็จะถูกปล่อยลงสู่พื้น แล้วขัดถูพื้นต่อไป

สารทำความสะอาดที่เป็นตัวมีข้อจำกัดของการใช้กับโลหะหรือพื้นผิวประเภทอื่นบางชนิดเท่านั้น โดยทั่วไปสารทำความสะอาดประเภทนี้ใช้สำหรับการทำความสะอาดแบบหมุนเวียน บางครั้งก็จำเป็นต้องใช้ทั้งสารทำความสะอาดที่เป็นกรดและด่าง

2.5 การทำความสะอาดโดยใช้ความดันสูง

ที่ความดันสูงนี้ น้ำแรงพอที่เกือบจะตัดคราบสกปรกออกได้หมดโดยแทบไม่ต้องใช้สารทำความสะอาด เมื่อฉีดพ่นสารทำความสะอาดปริมาณเล็กน้อยข้างไปที่คราบก็จะช่วยให้การกำจัดได้ผลดีขึ้นอย่างมากมาย

3. การทำความสะอาดด้วยถังแช่ (soak tank)

ถังแช่มีลักษณะแตกต่างกันไป ตั้งแต่อุปกรณ์ง่าย ๆ ทำจากถังน้ำมันไปจนถึงถังที่ออกแบบเป็นพิเศษ มีขดลวดความร้อน และเครื่องมือแสดงอุณหภูมิติดตั้งอยู่ด้วยถังแช่จัดเป็นหนึ่งในระบบทำความสะอาดที่ใช้กันมากที่สุด วิธีการใช้ต้องมีการเตรียมสารละลายใส่ถังไว้ และจะเททิ้งก็ต่อเมื่อเกิดการปนเปื้อนมาก ภาชนะและชิ้นส่วนอุปกรณ์ต่างๆ ที่เปื้อนจะแช่ไว้เป็นเวลานาน เพื่อให้คราบสกปรกคลายตัวลง และกำจัดออกไปในที่สุด กำลังของสารละลายตรวจสอบจากการไทเทรต การเติมสารทำความสะอาดเพิ่มอาจใช้เติมด้วยมือหรือใช้เครื่องทวงที่เหมาะสม การไทเทรตเป็นกระบวนการง่าย ๆ ผู้รับผิดชอบการทำความสะอาดถังทำหน้าที่ไทเทรตได้ กำลังของสารละลายที่ใช้งานขึ้นอยู่กับการใช้ได้อย่างปลอดภัยกับพื้นผิวที่ต้องการทำความสะอาดเท่านั้น เพราะว่ามือของพนักงานจะไม่ได้สัมผัสกับสารละลายแต่อย่างใด การกวนสารละลายในถังอาจใช้เครื่องมือกล หรืออากาศ หรือชุดกระบังกัน ซึ่งจะช่วยให้สารละลายหมุน เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของสารละลาย

การทำความสะอาดด้วยการแช่นำไปใช้ได้กับการทำความสะอาดอุปกรณ์หมุนเวียนน้ำร้อน อุปกรณ์ชิ้นใหญ่มักดัมในสารทำความสะอาด หรือที่เหมาะสมจนสารละลายเดือดก่อนใช้น้ำล้างคราบสกปรกต้องกำจัดออกไปเพื่อป้องกันมิให้ภาชนะเปื้อน

การทำความสะอาดในสายการผลิตของบริษัท เยนเนอรัล ฟู้ด โปรดักส์ จำกัด

วิธีเตรียมการเพื่อให้การทำความสะอาดได้ผล

- 1) กำจัดเศษอาหารขนาดใหญ่ออกจากบริเวณที่จะทำความสะอาด
- 2) ถอดชิ้นส่วนของเครื่องมือและอุปกรณ์เพื่อให้สามารถทำความสะอาดได้มากที่สุด
- 3) นำแผ่นฟิล์มพลาสติกคลุมส่วนที่เชื่อมต่อกับกระแสไฟฟ้า
- 4) ส่วนที่ทำความสะอาดแล้ว ให้แยกออกไปเพื่อหลีกเลี่ยงการล้างสิ่งสกปรกกลับมาเปื้อนเครื่องมือที่ทำความสะอาดแล้ว
- 5) กำจัดเศษของเสียขนาดใหญ่ออกจากเครื่องมือโดยใช้ทอลเมป้า ไม้กวาด ที่แฉะ หรืออุปกรณ์อื่นที่เหมาะสม

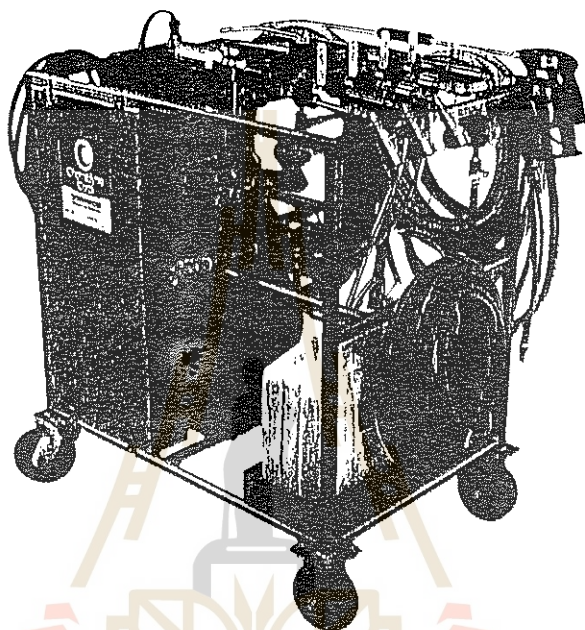
การทำความสะอาดบริเวณการผลิตควรกระทำทุกวัน บางครั้งทำในขณะที่ยังทำการผลิตอยู่เพื่อให้แน่ใจว่าเครื่องมือและอุปกรณ์ยังคงสะอาด หรือทำเมื่อหยุดเดินเครื่อง เครื่องมือทำความสะอาดสำหรับโรงงานเป็นแบบที่ง่ายต่อการใช้งาน อุปกรณ์ทำความสะอาดขั้นพื้นฐานที่ใช้กันอยู่ได้แก่ ไม้กวาด แปรงขัด ที่ตักขยะ ซึ่งใช้กำจัดฝุ่นและสิ่งสกปรกที่สะสมกันอยู่มาก และใช้งานได้ดีบนพื้นเรียบ ไม้ถูพื้นกำจัดฝุ่นใช้งานได้ดีบนพื้นเรียบที่มีการสะสมฝุ่นในระดับต่ำ ในบริเวณการผลิตควรมีเครื่องดูดฝุ่น ซึ่งการใช้เครื่องดูดฝุ่นเหมาะกับการกำจัดฝุ่นที่สะสมอยู่น้อยหรือปานกลางทั้งบนพื้นเรียบและพื้นที่ไม่สม่ำเสมอ ในโรงงานขนาดเล็กควรใช้เครื่องดูดฝุ่นชนิดที่เคลื่อนย้ายได้เพื่อสะดวกในการเคลื่อนย้ายไปตามบริเวณที่จะทำความสะอาด ไม่ควรใช้แบบที่ติดตั้งอยู่กับที่เนื่องจากมีราคาแพง ในกรณีโกดังเก็บขนาดใหญ่ควรใช้การกวาดมากกว่า แต่ในกระบวนการผลิตแป้งข้าวซึ่งใช้การไม่เปียกต้องมีการทำความสะอาดแบบเปียกด้วย (wet cleaning)

เครื่องมือทำความสะอาด

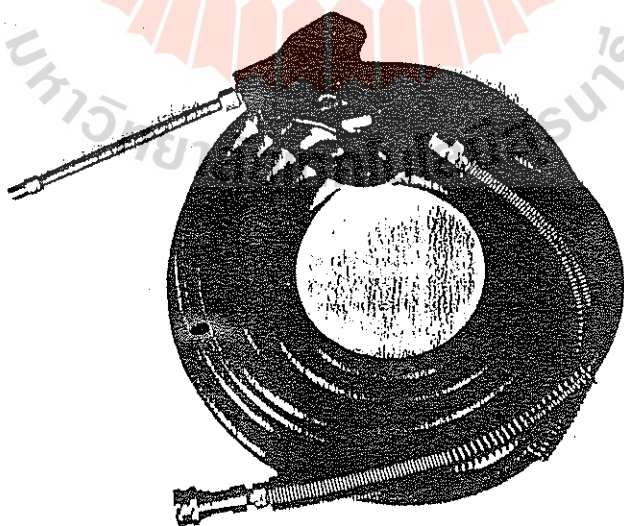
High-Pressure, Low-Volume Cleaning

เครื่องมือชนิดนี้ควรนำมาใช้กับการล้างอุปกรณ์ในบริเวณที่การเข้าถึงยาก ซึ่งจะทำให้ทำความสะอาดได้ดีขึ้น ใช้ทำความสะอาดได้ทั้งพื้นอาคารโรงงานและเครื่องมือ โดยเฉพาะใช้ได้ดีกับสายพานลำเลียงและเครื่องมือในการผลิตที่ไม่สามารถทำความสะอาดโดยการแช่ได้และทำความสะอาดโดยใช้แปรงขัดลำบาก มีทั้งแบบเคลื่อนย้ายได้และติดอยู่กับที่ โรงงาน

ขนาดเล็กควรใช้แบบเคลื่อนย้ายได้ ซึ่งประกอบด้วย air- หรือ motor-driven high-pressure pump, ถังบรรจุสารทำความสะอาด, สายยางส่งความดันสูง และหัวฉีด (ภาพที่ 2) นอกจากนี้ยังมีมาตรวัดที่ตั้งค่าปริมาณการใช้สารทำความสะอาดจากถังเก็บและผสมกับน้ำในอัตราส่วนที่ต้องการ สารละลายทำความสะอาดจะมีอุณหภูมิประมาณ 55 °C ที่ความดัน 20-85 kg/cm² และอัตราการปล่อยสาร 4-10 L/min หลักการทำความสะอาดแบบ high-pressure คือ การฉีดพ่นสารทำความสะอาดผ่านหัวฉีดด้วยความดันสูง ความเร็วและความแรงของสารทำความสะอาดที่กระทบบนพื้นผิวเครื่องมือที่ทำความสะอาดเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้การทำความสะอาดมีประสิทธิภาพ เครื่องมือนี้ช่วยลดการใช้สารและสารทำความสะอาด แต่มีการใช้แรงงานมากกว่าแบบติดตั้งอยู่กับที่เนื่องจากมีความเป็นอัตโนมัติน้อยกว่า ไม่คงทนเท่าที่ควรและต้องการการดูแลรักษาเป็นพิเศษ



ภาพที่ 2ก เครื่องล้างแบบ high-pressure, low-volume ชนิดเคลื่อนย้ายได้ ประกอบด้วยสายยางพร้อมปืนฉีดน้ำ, ถังเก็บสารทำความสะอาด, ท่อสำหรับการล้าง 2ท่อและท่อสำหรับสารฆ่าเชื้อ 1ท่อ



ภาพที่ 2ข ท่อฉีดน้ำแรงดันสูง ที่มีหัวฉีดด้วยอัตรา 4-10 ลิตร/นาที

High-Pressure Water Pump

มีทั้งแบบเคลื่อนย้ายและอยู่กับที่ ขึ้นอยู่กับปริมาตรและความต้องการของโรงงาน เครื่องแบบเคลื่อนย้ายได้มีขนาดเล็กกว่าแบบอยู่กับที่ ความสามารถของเครื่องอยู่ในช่วง 40-75 L/min ที่ความดันถึง 41.5 kg/cm² แบบเคลื่อนย้ายอาจประกอบกับถังสารละลายเพื่อผสมสารทำความสะอาดและสารฆ่าเชื้อ เครื่องชนิดนี้เหมาะกับโรงงานขนาดเล็ก

Water Hoses

ท่อน้ำต้องมีความยาวพอที่จะเข้าถึงบริเวณต่างๆได้ การทำความสะอาดที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพจะต้องมีหัวฉีดด้วย ซึ่งช่วยให้ฉีดพ่นได้ครอบคลุมพื้นที่การทำความสะอาดได้ทั่วถึงขึ้น หัวฉีดแบบ Fan-type เหมาะกับพื้นที่ขนาดใหญ่ ซึ่งช่วยลดเวลาการทำความสะอาดลง เศษสิ่งสกปรกที่ฝังตามรอยแตกกำจัดออกโดยการใช้ น้ำที่พุ่งเป็นสายตรง หัวฉีดแบบ Bent-type เหมาะกับการทำความสะอาดบริเวณรอบๆและใต้เครื่องจักรและอุปกรณ์ การล้างและการขัดที่ทำความสะอาดคู่กันควรใช้แปรงที่มีหัวฉีดพื้นด้วย

Brushes

แปรงที่ใช้ขัดควรเลือกรูปทรงที่ดีและเหมาะสมกับพื้นผิวที่ต้องการทำความสะอาด แปรงที่มีหัวฉีดระหว่างขนแปรงทำให้การทำความสะอาดตะแกรงและพื้นผิวอื่นๆในการดำเนินงานขนาดเล็กได้ผลดีเป็นที่น่าพอใจ ซึ่งรวมการฉีดน้ำและการขัดไว้ด้วยกัน ขนแปรงควรแข็งแรงแต่ต้องไม่ทำให้พื้นผิวเสียหาย ขนแปรงทำจากวัสดุหลายชนิดเช่น ขนม้า fiber ไนลอน ขนแปรงชนิด Bassine ซึ่งมีความแข็งแรงมากเหมาะสำหรับการขัดคราบสกปรกมาก ขนแปรงชนิด Palmetto fiber มีความแข็งแรงน้อยกว่าเหมาะสำหรับขัดคราบสกปรกปานกลางเช่น อุปกรณ์ที่ทำจากโลหะและยาง ขนแปรงชนิด Tampico เป็นขนชนิดอ่อนใช้ทำความสะอาดสิ่งสกปรกน้อยซึ่งต้องการแรงกดเพียงเบาๆ แปรงไนลอนมีความแข็งแรงมาก คงทน ไม่ดูดซับน้ำ

สารเคมีฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับโรงงาน

Hypochlorite

ไฮโปคลอไรต์เป็นสารประกอบคลอรีนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยามากที่สุด โรงงานอาหารโดยทั่วไปนิยมใช้กันมาก ที่นิยมใช้มากคือ แคลเซียมหรือโซเดียมไฮโปคลอไรต์ การยับยั้งจุลินทรีย์ต้องการระยะเวลาสัมผัส 1.5-100 วินาที สารละลายที่มีคลอรีนอิสระที่ออกฤทธิ์ (free available chlorine) ในระดับต่ำสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ลงได้ 90% ในเวลาน้อยกว่า 10 วินาที สปอร์แบคทีเรียทนต่อไฮโปคลอไรต์ได้มากกว่าเซลล์ที่กำลังเจริญ เวลาที่ใช้ลดจำนวนสปอร์ 90% อยู่ในช่วง 7 วินาที ถึง 20 นาที ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 10-1,000 เท่า ของความเข้มข้นที่ใช้กับเซลล์ที่มีการเจริญ ในกรณีของโรงงานผลิตแป้งข้าว เครื่องมือและอุปกรณ์ในการผลิตเป็นแบบติดตั้งกับที่ จึงต้องฆ่าเชื้อโดยการแปรงหรือฉีดพื้นผิวด้วยสารละลายคลอรีน ความเข้มข้นที่ใช้ 250-500 ppm หรือใช้การฉีดพ่นซึ่งปริมาณของสารละลายคลอรีนที่สัมผัสกับพื้นผิวก่อนล้างต่ำ ความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ 1,000 ppm

วิธีการคำนวณการเตรียมสารละลายคลอรีน

ตัวอย่าง เตรียมสารละลาย 200 ppm ในถัง 200 ลิตร สมมุติว่าใช้ 8.5% NaOCl

$$8.5\% \text{NaOCl} = 85,000 \text{ ppm } (0.085 \times 1,000,000)$$

$$1 \text{ ลิตร} = 1,000 \text{ ml}$$

$$200 \text{ ลิตร} = 200,000 \text{ ml}$$

$$\text{จากสูตร } C_1V_1 = C_2V_2$$

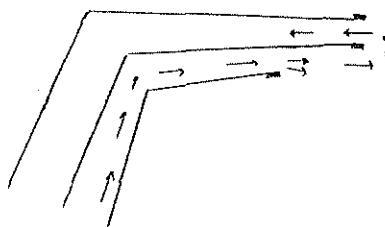
$$\begin{aligned}
 85,000 \text{ ppm} \times V &= 200 \text{ ppm} \times 200,000 \\
 V/200,000 \text{ ml} &= 200 \text{ ppm}/85,000 \text{ ppm} \\
 85,000X &= 40,000,000 \text{ ml} \\
 V &= 470 \text{ ml ของ } 8.5\% \text{NaOCl}
 \end{aligned}$$

วิธีการทำความสะอาดในโรงงาน

เมื่อพิจารณาอัตราการใช้ของจุลินทรีย์ 1 ครั้ง จากตัวอย่างข้าวและแป้งในขั้นตอนการผลิตต่างๆ บริเวณที่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์มากและควรเข้มงวดในการทำความสะอาดเป็นพิเศษ ได้แก่ ตัวโม้ และสายพาน ส่วนในบริเวณอื่นมีการปนเปื้อนน้อยกว่าจึงมีความจำเป็นในการทำความสะอาดน้อยกว่าแต่ก็ต้องมีวิธีการทำความสะอาดที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการทำความสะอาดด้วย

การทำความสะอาดควรปฏิบัติ ดังนี้

- | | |
|---------|---|
| บริเวณ | โกดังห้องข้าว |
| ความถี่ | ประจำวัน |
| วิธีการ | <ol style="list-style-type: none"> กวาดบริเวณโกดังห้องข้าวให้ทั่ว โดยเฉพาะตามซอกมุมห้องทั้งมุมด้านล่างและด้านบน ซึ่งเป็นที่หลบซ่อนของแมลงที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่ข้าวที่เก็บได้ ควรมีมาตรการป้องกันแมลงที่จะมาอาศัยอยู่ตามมุมห้องและใต้พาเลทข้าวโดยการฉีดพ่นสารป้องกันแมลงเป็นประจำ |
| บริเวณ | บ่อเทข้าว |
| ความถี่ | หลังการเทข้าวทุกครั้ง |
| วิธีการ | <ol style="list-style-type: none"> เก็บเศษเชือกหรือสิ่งสกปรกขนาดใหญ่ออก และกวาดข้าวที่ตกค้างบนตะแกรงบ่อเทข้าวลงไป ในบ่อให้หมด บริเวณพื้นรอบบ่อเทข้าวมีข้าวหล่นกระจัดกระจาย ต้องกวาดให้เรียบร้อยและนำไปทิ้งในบริเวณที่จัดไว้ |
| บริเวณ | การทำความสะอาดระบบแห้ง |
| ความถี่ | ทุกกะในช่วงการรับกะ |
| วิธีการ | <ol style="list-style-type: none"> พนักงานทำความสะอาดต้องสวมที่ปิดจมูกและหมวกก่อนการทำความสะอาดเพื่อป้องกันการฟุ้งกระจายของฝุ่น เก็บเศษเชือกและสิ่งสกปรกขนาดใหญ่ออกจากเครื่องจักรก่อน ทำความสะอาดเครื่องจักรโดยการเป่าและดูดฝุ่นที่อยู่ด้านในและด้านนอกเครื่องจักร อุปกรณ์ที่ใช้ควรเป็นเครื่องเป่าและดูดฝุ่นที่มีตัวเครื่องติดกัน สามารถเป่าและดูดฝุ่นได้ในขณะเดียวกัน ซึ่งอุปกรณ์นี้จะช่วยลดการฟุ้งกระจายของฝุ่นได้ |



ภาพที่ 3 เครื่องเป่าและดูดฝุ่น

4. บริเวณพื้นรอบเครื่องจักรจะมีข้าวร่วงหล่นอยู่ ให้กวาดและนำไปทิ้งในที่ที่จัดไว้
5. ดูดฝุ่นที่ยังหลงเหลืออยู่บนพื้นด้วยเครื่องดูดฝุ่น
6. เช็ดกระจกพลาสติกที่ตัวเครื่องด้วยผ้าเปียกหมาดๆ เพื่อให้กระจกใสสะอาดสามารถมองเห็นภายในเครื่องได้

*หมายเหตุ ตะแกรงภายในเครื่องจักร โดยเฉพาะเครื่องแยกกากที่มีตะกอนเกาะอยู่ค่อนข้างแน่นไม่สามารถใช้เครื่องเป่าและดูดออกได้ ให้ถอดออกไปล้างและขัดจนสะอาด ผึ่งให้แห้ง เป็นประจำทุกเดือน ในระหว่างที่นำตะแกรงไปทำความสะอาด ต้องมีตะแกรงอีก 1 ชุดเพื่อนำมาเปลี่ยนใช้งาน

*ข้อเสนอแนะ ควรมีระบบทำความสะอาดก่อนที่ข้าวจะผ่านกระบวนการทำความสะอาดระบบแห้ง โดยทำอุปกรณ์การเป่าเศษสิ่งสกปรกที่มีน้ำหนักเบาในระหว่างการลำเลียงข้าวมาตามกะพ้อ ลมจะถูกเป่าจากทางด้านล่างตะแกรง ทำให้เศษสิ่งสกปรกที่มีน้ำหนักเบาลอยขึ้น และมีลมจากด้านบนดูดออกไป



ภาพที่ 4 ระบบการเป่าลมเพื่อกำจัดเศษสิ่งสกปรกที่มีน้ำหนักเบา

บริเวณ	รางสกรูด้านบนถึงแช่
ความถี่	ทุกวันในช่วงรับกะ
วิธีการ	1. เปิดกระจกที่ปิดรางสกรูออก

2. ใช้อุปกรณ์เป่าและดูดฝุ่นเช่นเดียวกับการทำความสะอาดระบบแห้ง

*หมายเหตุ ควรถอดกระจกออกมาล้างทำความสะอาดทุกอาทิตย์

บริเวณ การแช่ข้าว

ความถี่ หลังการปล่อยข้าวลงรางสกรูทุกครั้ง

1. ถังแช่

ข้อเสนอนี้ แกนกลางที่กั้นระหว่างถังแช่ไม่สามารถป้องกันการปนเปื้อนข้ามถังแช่ได้ เนื่องจากในระหว่างการแช่มีการเป่าลมและทำให้น้ำในถังแช่กระเด็นออกมาปนกับข้าวในถังแช่ที่อยู่ติดกัน จึงควรทำแผ่นกั้นให้สูงขึ้นมาจากแกนกลางระหว่างถังให้สูงพอที่จะป้องกันการกระเด็นของน้ำได้

วิธีการทำความสะอาด

1. ใช้ปืนฉีดน้ำแรงดันสูงฉีดน้ำสะอาดไปตามพื้นผิวถังแช่ โดยเริ่มจากแผ่นกั้นระหว่างถังแช่ก่อน และค่อยๆ ฉีดไล่ไปจนถึงก้นถัง

2. กรวยปล่อยข้าวลงถังแช่

ข้อเสนอนี้ ควรทำกรวยปล่อยข้าวแบบถอดออกได้ ซึ่งแต่ละถังแช่จะมีที่สวมกรวยประจำอยู่ เมื่อจะปล่อยข้าวลงถังแช่ให้นำกรวยมาสวมไว้และถอดย้ายตำแหน่งเมื่อจะปล่อยข้าวลงถังต่อไป

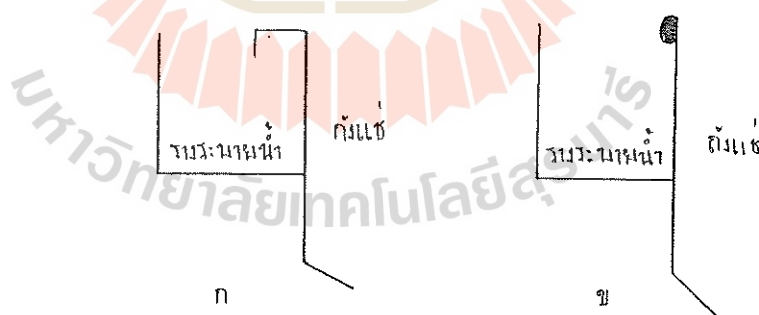
วิธีการทำความสะอาด

1. หลังแช่ข้าวครบ 4 ถัง ถอดกรวยออกมาทำความสะอาดโดยการขัดด้วยแปรงและล้างน้ำสะอาด เช็ดให้แห้งก่อนนำมาใช้งาน

บริเวณ

3. รางและท่อระบายน้ำที่ถังแช่

ข้อเสนอนี้ บริเวณรางระบายน้ำในบริเวณใต้ขอบถังแช่เป็นจุดที่มีการสะสมของตะกอนมากและทำความสะอาดได้ยาก ดังนั้นควรปรับปรุงขอบถังที่ไม่มีจุดอับทำให้ง่ายต่อการทำความสะอาดดังนี้



ภาพที่ 5 บริเวณรางระบายน้ำที่ถังแช่ : ก) แบบปัจจุบัน ข) แบบใหม่

วิธีการ

1. ฉีดน้ำโดยใช้สายยางฉีดไล่ฟองที่ไหลล้นออกมาจากถังแช่ ทุก 2 ชั่วโมง
2. ขัดรางระบายน้ำและตะแกรงระบายน้ำด้วยแปรงด้ามสั้น
3. ฉีดน้ำสะอาดล้างรางระบายน้ำ

บริเวณ
ความถี่
ข้อเสนอ

รางสกรูได้ถึงแช่
ทุกครั้งเมื่อสลับไม่
ท่อปล่อยข้าวแช่ลงรางสกรูควรถอดออกได้และมีฝาเปิดเพื่อช่วยในการทำความสะดวก ดังแสดง
ในภาพ



ภาพที่ 6 ท่อปล่อยข้าวลงรางสกรู

วิธีการ

1. ถอดท่อปล่อยข้าวลงรางสกรูออก และนำไปล้างและถูด้านในท่อด้วยแปรงด้ามยาว ล้างน้ำให้สะอาด
2. เปิดกระจกที่ปิดรางสกรูและเช็ดให้สะอาด
3. ฉีดน้ำแรงดันสูงล้างให้สะอาด

บริเวณ
ความถี่
วิธีการ

ชั้นไม่

ทุกครั้งที่หยุดใช้งาน

1. พนักงานทำความสะอาดควรสวมเสื้อกันน้ำและหน้ากากปิดหน้าป้องกันน้ำกระเด็น
2. ถอดกระบะและปล่อยปล่อยข้าวลงไม่ออก
3. เปิดตัวไม่ พร้อมทั้งถอดตะแกรงและแผ่นรองตะแกรงภายในตัวไม่ออก
บริเวณมอเตอร์ควรคลุมด้วยแผ่นพลาสติก ป้องกันน้ำกระเด็น
3. ฉีดน้ำโดยใช้เครื่องฉีดน้ำแรงดันสูง เข้าไปในตัวไม่ โดยเฉพาะที่ใบตี และฝาปิดตัวไม่
4. ขัดตะแกรง กระบะ และท่อปล่อยข้าวลงไม่ ล้างด้วยน้ำให้สะอาด
5. ประกอบอุปกรณ์ที่ถอดออกมาให้เรียบร้อย
6. ปล่อยน้ำยาฆ่าเชื้อเข้าไปในตัวไม่ และแช่ทิ้งไว้สักครู่
7. เปิดตัวไม่และระบายน้ำยาฆ่าเชื้อออก พร้อมทั้งฉีดน้ำล้างจนสะอาด

บริเวณ
ความถี่
ข้อเสนอ

ถังเก็บน้ำแบ่ง

สลับไม่

ทำถังน้ำแบ่งเพิ่มอีก 1 ถัง และสามารถเคลื่อนย้ายไปตามรางได้ แต่การใช้งานจะสลับกัน ถังที่ไม่ได้เก็บน้ำแบ่งจะทำความสะอาด

วิธีการ

1. ฉีดน้ำล้างคราบน้ำแป้งที่ตกค้างอยู่และระบายทิ้ง
2. เติมน้ำในถังแช่เพียงครึ่งถัง
3. เติมสารทำความสะอาด และเติมน้ำลงไปเพื่อให้สารทำความสะอาดกระจายออก
4. ก่อนการใช้งานประมาณครึ่งชั่วโมง ระบายน้ำยาทำความสะอาดออกและเก็บไว้ในถังเก็บสารทำความสะอาดที่ใช้แล้ว
5. ล้างด้วยน้ำสะอาด
6. ปล่องน้ำแป้งได้ไม่ให้เกิดออกและแช่น้ำยาทำความสะอาด ก่อนใช้งานล้างให้สะอาด

*หมายเหตุ
แป้งได้

ถังน้ำแป้งควรมีฝาปิดเพื่อป้องกันสิ่งสกปรกต่างๆและเชื้อจุลินทรีย์ที่มีในอากาศที่อาจปนเปื้อนลงในน้ำ

บริเวณ

แท่นอัด

1. แผ่นอัด

ความถี่

ทุก 16 ชั่วโมง

2. ท่อส่งน้ำแป้ง

ความถี่

ทุก 16 ชั่วโมง ก่อนล้างแผ่นอัด

3. พื้นทางเดินด้านบน

ความถี่

ทุกกะในช่วงรับกะ

4. พื้นด้านล่างแท่นอัด

ความถี่

ทุกกะในช่วงรับกะ

5. สายพาน

ความถี่

ทุกกะในช่วงรับกะก่อนทำความสะอาดพื้นรางระบายน้ำ

บริเวณ

เดือยหนู

ความถี่

ทุกวัน

บริเวณ

หน้าตู้

ความถี่

ทุกกะในช่วงรับกะ

วิธีการ

1. ปิดฝุ่นที่ผนังบริเวณหน้าตู้ด้วยไม้กวาดด้ามยาว
2. ทำความสะอาดจักรมือโดยการเป่าลมภายในเครื่อง ด้านนอกเครื่องเช็ดด้วยผ้าแห้ง สะอาด
3. เช็ดที่วางจักรมือด้วยผ้าแห้ง
4. เช็ดเครื่องชั่งน้ำหนักให้สะอาด
5. กวาดพื้นบริเวณหน้าตู้และนำไปทิ้งในที่ที่จัดไว้

บริเวณ

แผนกผสม

ความถี่

ทุกกะในช่วงรับกะ

วิธีการ

1. ปิดฝุ่นออกจากผนังและเพดานของแผนกผสมในแต่ละชั้น

2. บัดฝุ่นออกจากเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ส่วนภายในเครื่องเป่าลมขจัดฝุ่นออก
3. นำแผ่นพลาสติกคลุมอุปกรณ์และเครื่องมือที่ทำความสะอาดแล้ว
4. กวาดพื้นห้องและนำไปทิ้งในที่ที่จัดไว้

บริเวณ	ร้อนผสม
ความถี่	ก่อนและหลังร้อน
วิธีการ	ปฏิบัติเช่นเดียวกับบริเวณหน้าตู้ แต่มีการถอดตะแกรงออกมาทำความสะอาดทุก 2 อาทิตย์

การทำความสะอาดอุปกรณ์ทำความสะอาด

ผ้า, แปรงขัด, ไม้ถูพื้นและฟองน้ำ ควรถูด้วยน้ำสะอาด ผ่าเชื้อและทำให้แห้งหลังการใช้งาน



การวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา

จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในแป้งเกิดจากการปนเปื้อนมาจากวัตถุดิบและกระบวนการผลิต แป้งที่มีค่า a_w ต่ำหรือผ่านกระบวนการให้ความร้อนสูงจะเปิดโอกาสให้จุลินทรีย์รอดชีวิตและเจริญได้เพียงเล็กน้อย แต่การปนเปื้อนกลับมักเกิดขึ้นภายหลังจากนำแป้งไปประกอบอาหารหรือนำไปเป็นส่วนผสมของอาหาร ในกระบวนการผลิต ขั้นตอนการแช่ข้าวเป็นจุดวิกฤตที่ต้องควบคุมทางด้านจุลินทรีย์ อาจพบ *B. stearothermophilus*, *B. coagulan*, *C. thermosaccharolyticum*, *C. nigrificans*, mesophilic bacteria, ยีสต์และรา อยู่ในผลิตภัณฑ์แป้งแต่ไม่สามารถเจริญได้

โดยทั่วไปแป้งมีปริมาณจุลินทรีย์ดังนี้

standard plate count	< 50,000 SPC/g
Coliform	< 0.3 MPN Coliform/g
<i>E. coli</i>	< 0.3 MPN <i>E. coli</i> /g
ยีสต์และรา	< 100 Yeast & Mold/g
ไม่พบ <i>Salmonella</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i>	

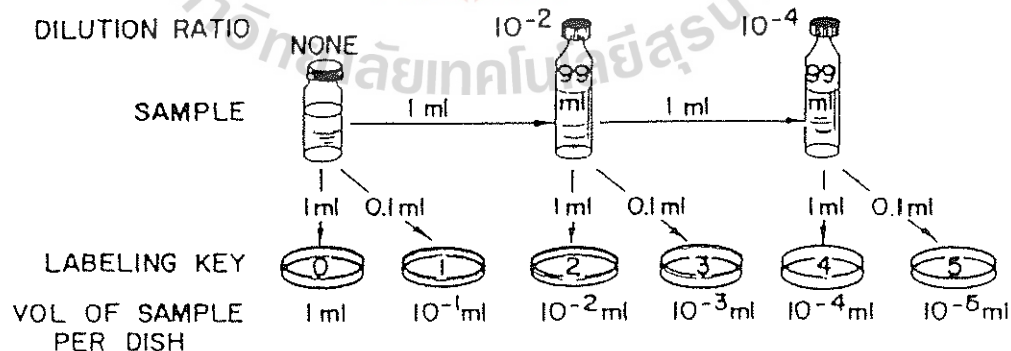
B. cereus และ aerobic sporeform อาจตรวจพบในแป้งที่ใช้เป็นส่วนผสมอาหารและเกิดการเจริญได้ในอาหารที่มีความชื้นสูง เช่น ข้าวสาลี พุดดิ้ง

ข้าวซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบของการผลิตแป้ง แบคทีเรียไม่เกิน 10^6 /g, ยีสต์และรา 10^4 /g

การทำการเจือจาง

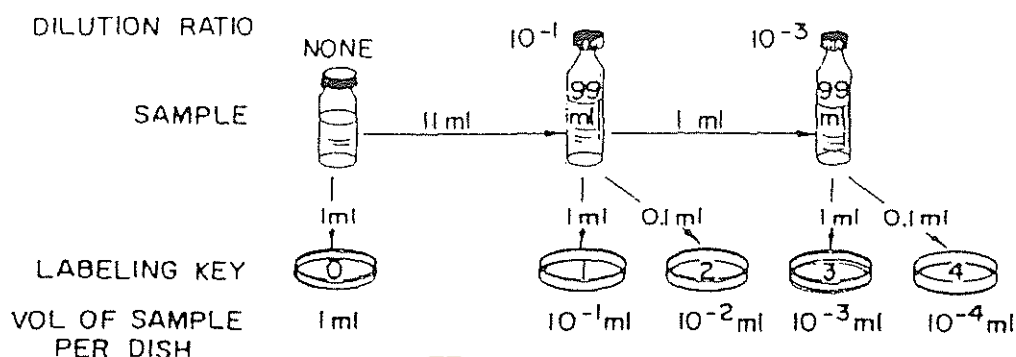
การรายงานผลการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ จะรายงานเป็นจำนวนโคโลนีต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร หรือ 1 กรัม ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนมากมักจะมีจำนวนจุลินทรีย์สูงมากเกินกว่าที่จะสามารถนับได้ ดังนั้นจึงต้องทำการเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายเจือจางเพื่อให้มีจำนวนโคโลนีต่อหนึ่งจานเลี้ยงเชื้อระหว่าง 30-300 การทำการเจือจางแสดงดังภาพที่ 9

I. METHOD OF EMPLOYING 1ml OF SAMPLE



ภาพที่ 7ก วิธีการเจือจางตัวอย่างอาหารโดยใช้ตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร

2. METHOD OF EMPLOYING 11 ml OF SAMPLE



ภาพที่ 7๗ วิธีการเจือจางตัวอย่างอาหารโดยใช้ตัวอย่าง 11.0 มิลลิลิตร

วิธีการเจือจาง

จุดตะเกียงแอลกอฮอล์ เปิดฝากระบอกปิเปต ลนบริเวณฝาเปิดของกระป๋องโดยรอบ หยิบปิเปต 1.0 มิลลิลิตร 1 อัน ออกจากกระป๋องโดยไม่ให้ปลายปิเปตสัมผัสกับส่วนอื่นนอกกระบอก ลนปลายปิเปตบนแปลตตะเกียง ดูดตัวอย่างจากขวดตัวอย่างโดยปลายปิเปตจุ่มลงในตัวอย่างไม่เกิน 1 นิ้ว ยกปิเปตให้ปลายอยู่สูงกว่าระดับของเหลว ค่อยๆปล่อยตัวอย่างออกจากปิเปตลงในขวดสารละลายเจือจาง โดยให้ปลายปิเปตแตะผนังด้านในของขวดตัวอย่าง เขย่าขวดขึ้นลง 25 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้สักครู่จนหมดฟองอากาศ ใช้สารละลายจากขวดนี้หรือทำการเจือจางต่อไป

การเตรียมตัวอย่าง

ซึ่งตัวอย่าง 25 กรัม(หรือทวิคูณของ 25) ใส่ในโถปั่นปลอดเชื้อ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต หรือสารละลาย peptone 0.1% 225 มิลลิลิตร ได้ความเจือจางเป็น 10 เท่า ผสมให้เข้ากันโดยการปั่นด้วยความเร็วสูง นาน 2 นาทีเพื่อให้เกิดความร้อนน้อยที่สุด (ควรใช้เครื่อง stomacher ตีบดตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยแผ่นโลหะตีบดอาหาร 2 แผ่น ตีบดอาหารสลับกัน) ในกรณีแบ่งผงไม่จำเป็นต้องปั่นก็ได้เพียงแต่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนการทำการเจือจางให้เตรียมสารละลายที่มีปริมาตร 9 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วทำการเจือจางต่อโดยใช้ปิเปตสาร 1 มิลลิลิตร การเจือจาง 10^6 เท่า นับว่าเพียงพอแล้ว ทำการเขย่าตัวอย่างที่เจือจางทั้งหมดขึ้นลงแรงๆ 25 ครั้ง ในระยะห่างสูงต่ำ 30 เซนติเมตร ใน 7 วินาที

วิธีการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ที่พบในข้าวและแป้ง

เชื้อจุลินทรีย์ที่ควรทำการตรวจวิเคราะห์ในแป้งและข้าว ได้แก่ aerobic bacteria, Coliforms , *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus*, *B. cereus*, ยีสต์และรา

Aerobic Plate Count

Dry Rehydratable Film Method (Petrifilm Aerobic Count Plate)

อุปกรณ์

1. บีบ 1.0 มิลลิลิตร ที่มีขีดแบ่งปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร
2. ลูกยางดูดหรือปั๊ม

3. เครื่องนับจำนวนโคโลนี
4. เครื่องปั่นความเร็วสูง
5. ที่เกลี่ย (spreader)
6. vortex mixer
7. ตู้บ่ม อุณหภูมิ 35°C

สารเคมี

1. Butterfield's Phosphate Buffer หรือ 0.1% peptone

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมตัวอย่างอาหารและทำการเจือจางตามวิธีการข้างต้น
2. วางแผ่นฟิล์ม aerobic count plate ลงบนพื้นราบ
3. เปิดแผ่นฟิล์มด้านบน แล้วเปิดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงตรงกลางแผ่นฟิล์ม
4. ปิดแผ่นฟิล์มด้านบนลงเบาๆ แล้วใช้ที่เกลี่ย (spreader) ด้านเว้าวางลงบนตำแหน่งที่เปิดอาหารลงไป พร้อมทั้งออกแรงกดเบาๆ ตรงศูนย์กลางที่เกลี่ย โดยไม่ต้องหมุนหรือขยับเพื่อให้ตัวอย่างกระจายเต็มแผ่นอาหารสำเร็จรูป
5. ทิ้งไว้ 1 นาทีให้เกิดเจลโดยสมบูรณ์ แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ นาน 48 ± 3 ชั่วโมง โดยด้านฟิล์มใสอยู่ด้านบน และซ้อนทับกันได้ไม่เกิน 20 แผ่น
6. เมื่อครบกำหนดเวลา นำมานับโคโลนีสีแดงที่เกิดขึ้นในช่วง 30-300 โคโลนี ถ้ายังไม่สามารถนับจำนวนโคโลนีได้ในขณะนั้น ต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิ $0-4.4^{\circ}\text{C}$ ไม่เกิน 24 ชั่วโมง

การคำนวณ

คูณจำนวนโคโลนีทั้งหมดต่อแผ่น(หรือในกรณีทำ 2 ซ้ำที่ระดับความเจือจางเดียวกัน ใช้จำนวนโดยเฉลี่ยต่อแผ่น)ด้วยระดับความเจือจาง ถ้าทำ 2 ซ้ำต้องคำนวณค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับความเจือจางก่อน แล้วจึงหาค่าเฉลี่ยของจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหาร ในกรณีที่จุลินทรีย์บนแผ่นฟิล์ม >300 โคโลนี ให้ประมาณค่าและรายงานค่าเป็น estimated counts (พื้นที่การเจริญของจุลินทรีย์ประมาณ 20 ตารางเซนติเมตร โดย 1 ช่องตาราง เท่ากับ 1 ตารางเซนติเมตร)

การตรวจวิเคราะห์ Coliforms และ *Escherichia coli*

อุปกรณ์

1. ปิเปต 1.0 มิลลิลิตร ที่มีขีดแบ่งปริมาตรละเอียด 0.1 มิลลิลิตร
2. ลูกยางหรือปั๊มดูดสาร
3. เครื่องนับจำนวนโคโลนี
4. เครื่องปั่นความเร็วสูง
5. vortex mixer
6. หลอด ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 3 มม. ทำจากสแตนเลส 24 gage
7. กล้องจุลทรรศน์
8. แผ่นสไลด์
9. ตู้บ่ม อุณหภูมิ $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ และ $35\pm 2^{\circ}\text{C}$

10. water bath อุณหภูมิ $44.0 \pm 2^\circ\text{C}$

11. จานเพาะเชื้อปลอดเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Plate count agar
2. Tryptone broth
3. Koser's citrate broth
4. MR-VP Medium
5. EC broth
6. Eosin methylene blue lactose sucrose agar
7. Lauryl sulfate tryptone broth
8. Brilliant green lactose bile broth 2%
9. Kovacs' Indole reagent
10. Methyl red indicator
11. Gram stain reagent เก็บที่ $2-8^\circ\text{C}$
12. Butterfield's Phosphate Buffer หรือ 0.1% peptone

วิธีการตรวจเชื้อ Coliforms

1. Multiple-Tube (MPN) fermentation Technique

Presumptive Test

1. เตรียมตัวอย่างอาหารและทำการเจือจางตามวิธีการข้างต้น
2. ดูดตัวอย่างจากทุกความเจือจางใส่ Lauryl sulfate tryptone broth (LST) ที่ความเจือจางละ 3 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 48 ± 2 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบการเกิดก๊าซทุก 24 ชั่วโมง เลือกหลอดที่มีก๊าซ(ให้ผลบวก) บันทึกผลจาก LST เป็น MPN/g (ดูตาราง MPN)

Confirmed Test

1. ถ่ายเชื้อจากหลอด LST ที่ให้ผลบวกที่สร้างก๊าซภายใน 48 ± 2 ชั่วโมง ลงใน BGB broth โดยใช้รูปรขนาด 3 มิลลิเมตร
2. นำ BGB broth ไปบ่มที่อุณหภูมิ $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ นาน 48 ± 2 ชั่วโมง
3. บันทึกผลจาก BGB broth ที่สร้างก๊าซและอ่าน MPN จากหลอดที่เจือจาง 3 ระดับ รายงานผลการยืนยันว่าเป็น Coliforms เป็น MPN/g หรือ MPN/ml

2. Solid Medium Method (VRBA)

1. พาสเจอร์ไรส์ VRBA โดยการต้มให้เดือด (เพราะถ้าไม่ฆ่าเชื้อจะลดความจำเพาะต่อเชื้อลง) ทำให้เย็นถึง 48°C ก่อนใช้
2. เลือกตัวอย่างที่เจือจางแล้วถ่ายใส่จานเพาะเชื้อ 2 จาน จานละ 1 มิลลิลิตร เท VRBA 10-15 มิลลิลิตร ลงในจาน เทยาจาน แล้วทิ้งให้อาหารแข็ง
3. เมื่ออาหารแข็งแล้วเท VRBA 3-5 มิลลิลิตรทับอีกครั้ง

4. ร่อนอาหารแข็งตัว แล้วจึงกลับจานนำไปบ่มที่ 35°C นาน 18-24 ชั่วโมง
5. นับเชื้อที่มีโคโลนีเป็นสีม่วง-แดง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร หรือใหญ่กว่า โดยรอบๆโคโลนีมีบริเวณตะกอนของ bile acids
6. ในการยืนยันเชื้อ เลือกโคโลนีที่เป็นตัวแทนของลักษณะโคโลนีชนิดต่างๆ ถ่ายใส่ BGB broth นำไปบ่มที่ 35°C นาน 24 และ 48 ชั่วโมง โคโลนีที่สร้างก๊าซจะเป็น coliforms
7. หลอดที่สร้างก๊าซและมีการจับตัวของเซลล์เป็นก้อนเล็กๆ ให้นำมาย้อมแกรมเพื่อแยกเชื้อที่เป็นแกรมบวก สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ออกไป
8. คำนวณจำนวน coliforms/g โดยการคูณจำนวนโคโลนีที่คาดว่าจะใช่ กับ%หลอดที่ทดสอบเป็นบวก แล้วคูณด้วยจำนวนเท่าของการเจือจาง

วิธีการตรวจ Fecal Coliforms และ *E. coli*

1. ถ่ายเชื้อจาก LST ที่ให้ผลบวกสร้างก๊าซภายใน 48±2 ชั่วโมง ลงใน EC broth โดยใช้รูขนาด 3 มิลลิเมตร
2. นำหลอด EC broth ไปบ่มที่อ่างน้ำอุณหภูมิ 44.5±0.2°C นาน 24±2 ชั่วโมง แล้วตรวจผลหลอดที่สร้างก๊าซ อ่านค่า MPN รายงานผล fecal coliforms เป็น MPN/g หรือ ml
3. ถ่ายเชื้อจากหลอด EC broth ที่สร้างก๊าซภายใน 48±2 ชั่วโมง โดยนำมาขีด(streak) บนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ EMB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24±2 ชั่วโมง
4. ดูลักษณะตรงกลางของโคโลนีว่า ตรงกลางโคโลนีมีสีเข้มอาจมีเหลืองขาวโหลหรือไม่ก็ตาม แล้วจึงเลือกอย่างน้อย 2 โคโลนีจาก EMB แต่ละจานเพาะเชื้อ โดยใช้เข็มแตะตรงกลางโคโลนี และถ่ายเชื้อลง PCA slant โคโลนีจะหลุด ถ้าไม่พบโคโลนีที่มีลักษณะตรงกลางมีสีเข้มก็ให้เลือกโคโลนีที่คาดว่าจะใช่ *E. coli* อย่างน้อย 2 โคโลนีหรือมากกว่าจากทุกจานเพาะเชื้อ ถ่ายเชื้อลง PCA slant นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 18-24 ชั่วโมง
5. ถ่ายเชื้อที่เจริญใน PCA slant ลงอาหารเหลวต่อไปนี้ เพื่อทดสอบทางชีวเคมีโดย
 - 5.1 ถ่ายเชื้อลง tryptone broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24±2 ชั่วโมง เพื่อทดสอบ indole เติม Kovacs'Indole reagent ประมาณ 0.3 มิลลิลิตร ถ้าให้ผลเป็นบวก ผิวชั้นบนจะเป็นสีแดง
 - 5.2 ถ่ายเชื้อลง MR-VP medium นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 48±2 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อโดยวิธีการปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตรลงในหลอดขนาด 13×100 มิลลิเมตร เพื่อทดสอบ acetylmethylcarbinol โดยเติม alcoholic alpha-naphthol 0.6 มิลลิลิตร และเติม 40%KOH 0.2 มิลลิลิตร แล้วเขย่าก่อนเติมเกล็ด creatine 2-3 เกล็ด นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง ถ้าผลเป็นบวกจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูของ eosin
 - 5.3 บ่มเชื้อใน MR-VP ที่เหลือต่ออีก 48 ชั่วโมง และทดสอบปฏิกิริยากับ methyl red โดยหยดสารละลาย methyl red 5 หยดลงในหลอดเชื้อ ถ้าให้ผลบวกอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีแดง ถ้าได้ผลลบจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือสีส้ม
 - 5.4 ถ่ายเชื้อใส่ Koser citrate broth บ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 96 ชั่วโมง ตรวจผลการเจริญว่ามี(เป็นบวก) หรือไม่มี(เป็นลบ)
 - 5.5 ถ่ายเชื้อใส่ LST broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 48±2 ชั่วโมง ตรวจหลอดที่สร้างก๊าซจากน้ำตาลแลคโตส

6. ย้อมสีเซลล์โดยนำเซลล์จาก PCA slant อายุ 18 ชั่วโมง ถ้าเป็น coliforms จะได้สีแดง (ไม่ติดสี, เป็นแกรมลบ) ส่วนจุลินทรีย์ที่ย้อมติดสี (เป็นแกรมบวก) จะให้สีน้ำเงิน-ดำ
7. คำนวณ MPN ของ *E. coli*g จากเชื้อที่เป็นแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง ไม่สร้างสปอร์ ซึ่งสามารถให้ก๊าซจากน้ำตาลแลคโตส และให้ผลการทดสอบ IMViC เป็น ++-- หรือ --++

วิธีการตรวจ Coliforms และ *E. coli* โดย แผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป (Petrifilm Count Plate)

อุปกรณ์

1. ปิเปต 1.0 มิลลิลิตร ที่มีขีดแบ่งปริมาตรละเอียด 0.1 มิลลิลิตร
2. ลูกยางหรือปั๊มดูด
3. เครื่องนับจำนวนโคโลนี
4. เครื่องปั่นความเร็วสูง
5. vortex mixer
6. แผ่น Petrifilm *E. coli* Count Plate
7. แผ่น Petrifilm Coliforms Count Plate
8. spreader
9. ตู้บ่ม อุณหภูมิ 35°C

สารเคมี

Butterfield's Phosphate Buffer หรือ 0.1% peptone

วิธีการ

Coliform count

1. เตรียมตัวอย่างอาหารและทำการเจือจางตามวิธีการข้างต้น
2. วางแผ่นฟิล์ม coliform count plate ลงบนพื้นราบ
3. เปิดแผ่นฟิล์มด้านบน แล้วปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงตรงกลางแผ่นฟิล์ม
4. ปิดแผ่นฟิล์มด้านบนลงเบาๆ แล้วใช้ที่เกลี่ย (spreader) ด้านเรียบวางลงบนตำแหน่งที่ปิเปตอาหารลงไป พร้อมทั้งออกแรงกดเบาๆ ตรงศูนย์กลางที่เกลี่ย โดยไม่ต้องหมุนหรือขยับเพื่อให้ตัวอย่างกระจายเต็มแผ่นอาหารสำเร็จรูป
5. ทิ้งไว้ 1 นาทีให้เกิดเจลโดยสมบูรณ์ แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24±2 ชั่วโมง โดยด้านฟิล์มใสอยู่ด้านบนและซ้อนทับกันได้ไม่เกิน 20 แผ่น
6. เมื่อครบกำหนดเวลา นำมานับโคโลนีสีแดงที่เกิดขึ้นพร้อมกับฟองอากาศในช่วง 30-300 โคโลนี ส่วนโคโลนีสีแดงที่ไม่มีฟองอากาศไม่ต้องนับจำนวน ถ้ายังไม่สามารถนับจำนวนโคโลนีได้ในขณะนั้น ต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิแช่แข็ง ไม่เกิน 24 ชั่วโมง

E. coli count plates

วิธีการเดียวกับ Petrifilm Coliform Count Plate แต่เพิ่มเวลาการบ่มอีก 24±2 ชั่วโมง (รวมทั้งหมด 48±4 ชั่วโมง) *E. coli* จะมีโคโลนีสีน้ำเงินหรือม่วงที่มีฟองอากาศ ส่วน coliforms อื่นจะมีโคโลนีสีแดงที่มีฟองอากาศ

การตรวจวิเคราะห์ *Bacillus cereus*

อุปกรณ์

1. ปิเปต 1.0 มิลลิลิตร ที่มีขีดแบ่งปริมาตรละเอียด 0.1 มิลลิลิตร
2. ลูกยางหรือปั๊มดูด
3. เครื่องนับจำนวนโคโลนี
4. เครื่องปั่นความเร็วสูง
5. vortex mixer
6. แท่งแก้วปลอดเชื้อ
7. ลูบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2 มม. ทำจากลวดนิกโครม 26 gage และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 3 มม. ทำจากลวดนิกโครม 24 gage
8. กล้องจุลทรรศน์
9. แผ่นสไลด์

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Mannitol-egg yolk polymyxin (MYP) agar
2. Phynol red-dextrose broth
3. Nitrate broth
4. Nutrient agar slant
5. Nutrient agar plate
6. Nutrient broth with lysozyme
7. Modified Voges-Proskauer(VP) medium
8. Butterfield's buffered phosphate diluent
9. Nitrate test reagent
10. Voges-Proskauer(VP) test reagent

วิธีการ

Presumptive test

1. เตรียมตัวอย่างอาหารและทำการเจือจางตามวิธีการข้างต้น
2. ปิเปตตัวอย่างอาหารที่เจือจางแต่ละระดับความเจือจางมา 1 มิลลิลิตร หยดลงบน selective medium (Mannitol egg yolk polymyxin B, MYP, agar) เกลี่ยตัวอย่างอาหารให้ทั่วผิวน้ำอาหารโดยใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อ บ่มที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. และบ่มต่อไปอีกที่อุณหภูมิ $25-30^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. โคโลนีของเชื้อ *B. cereus* จะมีสีชมพู(ไม่สามารถหมัก mannitol) ซึ่งล้อมรอบด้วยบริเวณขาวขุ่น(lecithinase production) นับจำนวนโคโลนีต่อกรัมอาหาร

Confirm test การยืนยันเชื้อ *B. cereus*

1. เก็บเชื้อที่มีลักษณะดังกล่าว 5 โคโลนีจากแต่ละจานและถ่ายลงใน nutrient agar slant

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชั่วโมง
3. เก็บโคโลนีของ *B. cereus* มาย้อมสีแกรม

การย้อมสีของ *B. cereus*

1. นำโคโลนีของ *B. cereus* เกลี่ยให้เป็นฟิล์มบางๆบนแผ่นสไลด์ทิ้งให้แห้ง
 2. วางแผ่นสไลด์ให้เหนือน้ำเดือด และย้อมด้วย 5% malachite green 2 นาที ล้างด้วยน้ำและซับให้แห้ง ย้อมทับด้วย 0.3% sudan black ใน 70% alcohol 15 นาที ล้างด้วย xylol และซับให้แห้ง ย้อมด้วย 0.5% safranin 20 วินาที ล้างและทิ้งไว้ให้แห้ง
 3. *B. cereus* มีลักษณะรูปร่างยาวกลมเป็นสายโซ่สั้นและยาว สปอร์จะมีรูปร่างรูปไข่ อยู่ตรงกลางเซลล์ หรือค่อนข้างไปทางส่วนปลายของเซลล์ ไม่ทำให้เซลล์พอง สปอร์จะติดสีเขียว
4. ถ้วยเชื้อจาก NA slant ลงในหลอดขนาด 100×13 มิลลิเมตร ที่มีน้ำยาฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer บ่มเชื้อในอาหารดังต่อไปนี้
- a) Phenol red dextrose broth ใช้รูปขนาด 2 มิลลิเมตรถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24 ชั่วโมงใน GasPak anaerobic jar เขย่าหลอดและตรวจผล อาหารเหลวจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง แสดงว่ามีการสร้างกรดจากการใช้ dextrose ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ
 - b) Nitrate broth ใช้รูปขนาด 3 มิลลิเมตรถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24 ชั่วโมง และทดสอบว่ามีไนเตรดเกิดขึ้นหรือไม่ โดยเติม nitrate test Reagent A 0.25 มิลลิลิตร และ Reagent B 0.25 มิลลิลิตร อาหารเหลวจะกลายเป็นสีส้มภายใน 10 นาที แสดงว่ามีไนเตรดอยู่
 - c) Modified VP medium ใช้รูปขนาด 3 มิลลิเมตรถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 1 มิลลิลิตรลงในหลอดเปล่าเพื่อทดสอบ acetylmethylcarbinol แล้วเติมสารละลาย 40% KOH 0.2 มิลลิลิตร และสารละลาย 5% alcohol α -naphthol 0.6 มิลลิลิตร และเกล็ด creatine ที่ไว้ 1 ชั่วโมง ผลการทดสอบเป็นบวกถ้าเกิดสีชมพูขึ้น
 - d) Nutrient agar with L-tyrosine ใช้รูปขนาด 3 มิลลิเมตรถ่ายเชื้อลงบนผิวอาหาร slant แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยสังเกตบริเวณใสบนอาหารใกล้ๆกับที่มีการเจริญของเชื้อ ซึ่งแสดงว่ามีการย่อย tyrosine นำหลอดที่ให้ผลลบและนำไปบ่มต่อ อีก 72 ชั่วโมง ก่อนนำไปทำจัดตั้ง
- Nutrient broth with lysozyme ใช้รูปขนาด 2 มิลลิเมตรถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวที่มี 0.001% lysozyme แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24 ชั่วโมง บันทึกผลการเจริญเป็น + หรือ - บ่มหลอดที่ให้ผลลบต่ออีก 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปทำจัดตั้ง
- MYP agar ถ่ายเชื้อลงบนอาหาร MYP agar plate ในบริเวณที่ทำเครื่องหมายไว้ซึ่งมีพื้นที่ 4 ตารางเซนติเมตร ปลอຍให้อาหารซึมเข้าไปในเนื้อก้อน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24 ชั่วโมง ตรวจว่ามีตะกอนล้อมรอบโคโลนีสีชมพูหรือไม่

เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกขนาดใหญ่ ที่มีรูปร่างกลมยาวต่อกันเป็นสายโซ่ สร้าง lecithinase และไม่หมัก mannitol บนอาหาร MYP agar สามารถสร้างกรดจากการใช้ เด็กซ์โทรสในสภาวะไม่มีอากาศ รีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ สร้าง acetylmethylcarbinol ย่อยสลาย L-tyrosine และเจริญในอาหารที่มี 0.001% lysozyme จึงระบุได้ว่าเป็นเชื้อ *B. cereus*

การคำนวณจำนวน *B. cereus* ในอาหาร โดยคิดจาก %โคโลนีที่นำมาทดสอบทำการยืนยันเชื้อและโคโลนีที่ได้จากการยืนยันเชื้อ เช่น ที่ระดับความเจือจาง 10^{-4} มีจำนวนเชื้อ 65 โคโลนีและเก็บ 4-5 โคโลนีมาทำการยืนยันเชื้อ ดังนั้นจำนวนเชื้อ คือ $65 \times (4/5) \times 10,000 \times 10 = 5,200,000 \text{ B. cereus /g}$ (Dilution factor = 10)

การตรวจวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus*

อุปกรณ์

1. ปิเปต 1.0 มิลลิลิตร ที่มีขีดแบ่งปริมาตรละเอียด 0.1 มิลลิลิตร
2. ลูกยางหรือปั๊ม
2. เครื่องนับจำนวนโคโลนี
3. เครื่องปั่นความเร็วสูง
4. vortex mixer
5. water bath อุณหภูมิ 35-37°C
6. ตู้บ่ม อุณหภูมิ 35-37°C
7. ไม้หยดที่ปลอดเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Butterfield's Phosphate Buffer หรือ 0.1% peptone
2. Baird-Parker medium
3. Trypticase (tryptic) soy agar
4. Brain heart infusion (BHI) broth
5. Coagulase plasma (rabbit) with EDTA
6. Tryptone yeast extract agar
7. Catalase test

การเตรียมตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 50 กรัม ใส่ในเครื่องปั่น (ถ้าผลิตภัณฑ์เป็นผงละเอียดไม่ต้องปั่น) เติมน้ำละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 450 มิลลิลิตร บ่มนาน 2 นาที นำไปทำการเจือจางให้เสร็จภายใน 15 นาที
2. ทำการเจือจางตัวอย่างโดยให้ตัวอย่างที่มีการเจือจางสูงสุดต้องอ่านผลเป็นลบ

วิธีการ

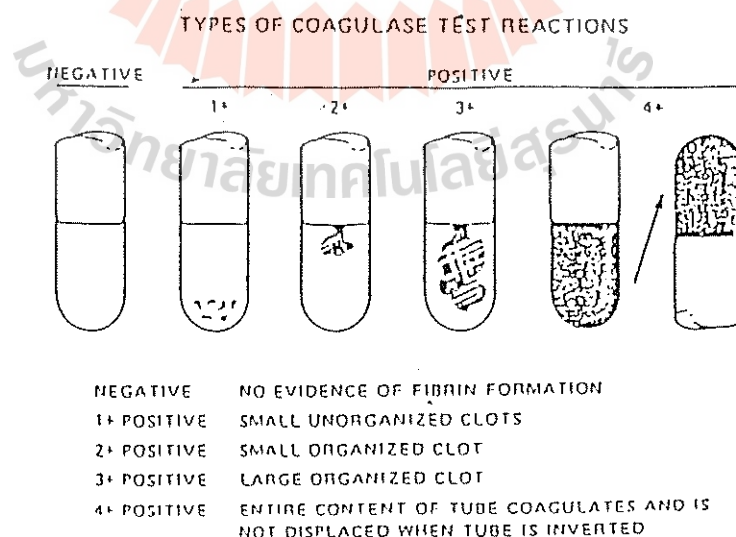
Presumptive Test

1. ใช้ตัวอย่างจากการเจือจางอย่างน้อย 2 ระดับความเจือจาง โดยถ่ายสารละลาย 1 มิลลิลิตร ในแต่ละระดับความเจือจางลงในจานเพาะเชื้อ 3 จาน ที่มี Baird-Parker medium เช่น จานละ 0.4, 0.3, และ 0.3 มิลลิลิตร

2. เกลี่ยสารละลายให้ทั่วผิวของอาหารร่วน โดยใช้แท่งไม้หยอกที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยระวังอย่าให้โดนขอบจาน ทั้งจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในลักษณะวางตั้ง จนกว่าผิวของร่วนจะดูดสารละลายจนแห้ง (ประมาณ 10 นาที สำหรับอาหารที่แห้งพอเหมาะ) หรืออาจวางจานเพาะไว้ในตู้บ่มในลักษณะตั้งตรงประมาณ 1 ชั่วโมง ก่อนกลับจาน
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $35-37^{\circ}\text{C}$ นาน 45-48 ชั่วโมง
4. เลือกจานที่มีโคโลนีในช่วง 20-200 โคโลนี นับโคโลนีที่คาดว่าจะเชื้อ *S. aureus* ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร มีสีดำเข้มถึงดำเทา ผิวเรียบ หนุน มีขอบโดยรอบ ขอบจะมีสีขาวคล้ำ และอาจมีบริเวณหนุนโดยรอบโคโลนี และอาจมีแนวไล่ถัดจากแนวหนุนด้วยก็ได้ เมื่อใช้เข็มเย็บตะมีลักษณะเหมือนเนยหรือยาง ถ้านำไปย้อมสีแบบแกรมจะให้ผลบวก ลักษณะกลม อยู่แบบเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือมักพบเป็นกลุ่มคล้ายรวงองุ่น

Confirmed Test

5. นำโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *S. aureus* จากจานเลี้ยงเชื้ออย่างน้อย 1 โคโลนี (ปกติ 2-3 โคโลนี) ถ้ายใส่หลอดที่มีอาหารเหลว brain heart infusion 2.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer แล้วถ่ายเชื้อจากหลอดนี้ 1 ลูบ ใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ (slant agar) tryptone glucose extract agar หรือ trypticase soy agar บ่มหลอดอาหารเหลวและอาหารร่วนที่อุณหภูมิ $35-37^{\circ}\text{C}$ นาน 18-24 ชั่วโมง เก็บหลอดอาหารร่วนไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้ตรวจผลซ้ำในกรณีที่เกิดการทดสอบ coagulase มีปัญหา หลอดอาหารเหลวนำไปทดสอบ coagulase
6. หลอดที่จะทดสอบหา coagulase ให้เติม 0.5 มิลลิลิตร ของ coagulase plasma ที่มี EDTA ลงในหลอดขนาด 10×75 มิลลิเมตร ซึ่งมีอาหารเหลว (จากข้อ 5) อยู่ 0.2 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ $35-37^{\circ}\text{C}$ ดูผลเป็นช่วงๆ ในเวลา 6 ชั่วโมง ว่าเกิดการจับตัวเป็นก้อนหรือไม่ การจับตัวเป็นก้อนมีลักษณะ 3+ และ 4+ ตามภาพที่ 10 ถือว่ามีผลเป็นบวก และตรวจผลซ้ำโดยบ่มที่ $35-37^{\circ}\text{C}$ ไม่ต่ำกว่า 18 ชั่วโมง แต่ไม่เกิน 48 ชั่วโมง ในการทดสอบทุกครั้งควรมี plasma control โดยตรวจสอบกับ standard *S. aureus* coagulase positive strain
7. รวมจำนวนโคโลนีลักษณะที่ให้ผลบวกจากการตรวจ coagulase จากทั้ง 3 จานเพาะเชื้อที่แบ่งใส่ตัวอย่างที่เจาะจงครั้งเดียวกัน แล้วคูณด้วยจำนวนเท่าของการเจาะจง รายงานผลเป็น *S. aureus*/g



ภาพที่ 8 ชนิดของการเกิดปฏิกิริยาเมื่อทดสอบ coagulase

การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp.

อุปกรณ์

1. ปิเปต 1.0 มิลลิลิตร ที่มีขีดแบ่งปริมาตรละเอียด 0.1 มิลลิลิตร
2. ลูกยางหรือปั๊มดูด
3. เครื่องนับจำนวนโคโลนี
4. เครื่องปั่นความเร็วสูง
5. vortex mixer
6. ตู้บ่ม อุณหภูมิ 35-37°C
7. เข็มเย็บปลอดเชื้อ
8. ปิเปต 10.0 มิลลิลิตร
9. หลอดแก้วปลอดเชื้อ
10. สไลด์

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Broth Base
2. Selective Supplement
3. Rambach Agar
4. Tryptone Broth
5. Triple Sugar Iron Agar
6. Lysine Iron Agar
7. Voges-Proskauer (VP) test reagent
8. Simmon's Citrate Agar
9. Phenol Red Lactose Broth
10. Peptone Water (0.1%)
11. Alpha-naphthol 10%
12. Methyl Red Indicator
13. Potassium Hydroxide Solution 40%
14. Salmonella Polyvalent Somatic O antiserum
15. Creatine
16. Sodium Chloride 0.85%

การเตรียมตัวอย่าง

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ในเครื่องปั่น เติม broth base ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 225 มิลลิลิตร บั๊นนาน 2 นาที ในกรณีตัวอย่างแบ่งไม่ต้องปั่นก็ได้
2. ถ่ายใส่ภาชนะที่มีฝาปิด ขนาด 500 มิลลิลิตร

3. ปิดฝาโดยคลายฝาออก 1/4 รอบ บ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 7 ± 1 ชั่วโมง
4. นำไปตรวจตามวิธีแยกเชื้อ

วิธีการแยกเชื้อ

1. ปิดฝาภาชนะให้สนิทเขย่าตัวอย่างซึ่งบ่มแล้วเบาๆ ก่อนถ่ายตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้ว
2. เติมหอาหารเสริมการแยกเชื้อ(selective supplement) 1 เม็ด ลงในหลอดที่ได้รับการถ่ายเชื้อ 10 มิลลิลิตร แล้วนั้น เขย่าหลอดให้อาหารเสริมการแยกเชื้อละลายนาน 10-30 นาที
3. นำหลอดไปบ่มที่ 35°C นาน 20 ± 2 ชั่วโมง
4. ถ่ายเชื้อจากหลอดโดยขีดลงบน Rambach Agar แล้วนำไปบ่มที่ $35-37^{\circ}\text{C}$ นาน 24 ชั่วโมง
5. ลักษณะของโคโลนีของเชื้อที่เจริญได้เป็นดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญบน Rambach Agar

จุลินทรีย์	สีของโคโลนี
<i>Salmonella</i> spp.	แดง
<i>Salmonella typhi</i>	ไม่มีสี
<i>Salmonella paratyphi</i> A	ไม่มีสี
<i>E. coli</i>	สีน้ำเงิน-เขียว
<i>Klebsiella</i> spp.	สีน้ำเงินม่วง
<i>Citrobacter</i> spp.	สีน้ำเงิน-เขียว
<i>Proteus</i> spp.	ไม่มีสี
<i>Shigella</i> spp.	ไม่มีสี

6. เลือกโคโลนีที่มีสีแดงและสีขาว ไปทดสอบทางชีวเคมีและปฏิกิริยาของเซลล์ทางเซรัมวิทยา

การทดสอบลักษณะทางชีวเคมี

1. เลือกโคโลนีซึ่งคาดว่าจะ เป็น *Salmonella* อย่างน้อย 2 โคโลนีจากอาหารเลี้ยงเชื้อ (แล้วเก็บงานเพาะเชื้อไว้ที่ $5-8^{\circ}\text{C}$) แล้วนำไปเพาะเชื้อ โดยใช้เข็มเย็บเชื้อแทงเชื้อลงในด้านล่างของอาหารวุ้น ได้แก่
 - Triple sugar iron agar (TSI) โดยการขีดบนผิวอาหารแล้วแทงลงที่ก้นหลอด (butt)
 - Lysine Iron Agar (LIA) โดยใช้เข็มเย็บเชื้ออันเดียวกับ TSI (ซึ่งไม่เย็บเชื้อเพิ่มจากโคโลนีและไม่เผาไฟ) แทงลงไปในด้านล่างของอาหารวุ้นให้ลึกประมาณ 4 เซนติเมตร 2 ครั้งแล้วจึงขีดบนอาหาร (streak) บนอาหาร TSI, LIA บ่มที่ $35 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ นาน 24 ± 2 และ 48 ± 2 ชั่วโมง ตามลำดับโดยปิดฝาหลวมๆ เพื่อให้มีอากาศระหว่างบ่มจะได้ไม่มีการสร้าง H_2S มากเกินไป
2. Simmon's citrate agar (CA) test

ถ่ายเชื้อจาก TSI agar โดยการขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมทั้งแทงลงในก้นหลอดของอาหารด้วย นำไปบ่มที่ 35°C นาน 96 ± 2 ชั่วโมง

3. Indole Test

ถ่ายเชื้อปริมาณเล็กน้อยจาก TSI agar ลงใน Tryptophane หรือ Tryptone broth บ่มที่ 35°C นาน 24 ± 2 ชั่วโมง แล้วถ่ายอาหาร 5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดสอบ หยด Kovac's reagent 0.2-0.3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบ salmonella จะให้ผลการทดสอบเป็นลบคือ ที่ผิวของสารละลายจะให้สีเหลือง (ไม่ให้สีแดง) ในการทดสอบทางชีวเคมี ถ้าโคโลนีซึ่งไม่มีสีบน Rambach agar แต่ให้ผลการทดสอบเป็น *Salmonella* ทุกประการ ให้สงสัยว่าเชื้อนั้นอาจเป็น *Salmonella typhi* หรือ *Salmonella paratyphi A* ให้ทดสอบทางเซรัมวิทยาต่อเชื้อ *Shigella* ซึ่งให้โคโลนีไม่มีสีบน Rambach agar เช่นกัน เมื่อทดสอบทางชีวเคมีจะให้ผลที่แตกต่างจาก *Salmonella* ดังนี้

TSI ไม่ผลิต H_2S , ไม่สร้างแก๊ส

LIA ให้สีเหลืองใน butt เนื่องจากไม่มี Lysine decarboxylase

CA ไม่เจริญเนื่องจากไม่สามารถใช้ citrate

Indole กลุ่ม A, B, C จะให้ผลบวก

ส่วนเชื้อ *Proteus* ซึ่งให้โคโลนีไม่มีสีบน Rambach agar ให้ผลการทดสอบที่แตกต่างจาก *Salmonella* ดังนี้

TSI ให้ acid slant และ acid butt

LIA ให้ red slant และ acid butt

4. Phenol red lactose broth (PR) test

ถ่ายเชื้อจาก TSI agar ซึ่งผ่านการบ่มแล้ว 24-48 ชั่วโมง ลงใน Phenol red lactose broth บ่มที่ 35°C นาน 48 ± 1 ชั่วโมง แต่ให้ตรวจหลังจากบ่มได้ 24 ชั่วโมงแล้ว ถ้าเป็น *Salmonella* จะให้ผลปฏิกิริยาเป็นลบ คือไม่เกิดก๊าซ และสีของสารละลายยังเป็นสีแดง

5. Methyl Red Voges-Proskauer (MR-VP) test

1) Voges-Proskauer (VP) test

ถ่ายเชื้อจาก TSI agar ลงใน VP broth บ่มที่ 35°C นาน 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดสอบ นำใน VP broth ที่เหลือบ่มต่ออีก 48 ชั่วโมง ส่วนในหลอดทดสอบที่แบ่งถ่าย VP broth มานั้น

เติม 10% alpha-naphthol 0.6 มิลลิลิตรแล้วเขย่าให้เข้ากัน

เติม 40% KOH 0.2 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน

เติม creatine 2-3 เกล็ดเพื่อเร่งปฏิกิริยา อ่านผลหลังจาก 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง *Salmonella* จะได้ผลปฏิกิริยาเป็นลบ โดยจะไม่ทำให้เกิดสีชมพูหรือแดงทับทิมในสารละลาย

2) Methyl red (MR) test

ถ่ายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตรจาก VP broth ซึ่งผ่านการบ่มมา 96 ชั่วโมงแล้ว ลงในหลอดทดสอบ หยด methyl red indicator 5-6 หยด อ่านผลทันที

การทดสอบเซรัมวิทยา

Somatic (O) test

ใช้ดินสอไข แบ่งช่องแผ่นสไลด์หรือจานเพาะเชื้อออกเป็น 2 ช่อง ขนาด 1×2 เซนติเมตร ถ่ายเชื้อครึ่งเข็มเชื้ออย่างกลมจาก TSI agar ซึ่งบ่มไว้แล้ว 24-48 ชั่วโมง ลงส่วนบนของช่องที่ขีดไว้แต่ละช่อง หยดสารละลาย NaCl (0.85%) 1 หยด ลงบนส่วนล่างของช่องที่ขีดไว้เพียง 1 ช่องเท่านั้น เติม *Salmonella* polyvalent somatic (O) antiserum 1 มิลลิลิตร ลงบนส่วนล่างของอีกช่องที่เหลือ ใช้เข็มเชื้อที่สะอาดคนให้เชื้อเข้ากับน้ำเกลือก่อนแล้วคนเชื้อกับ antiserum O เขียงแผ่นสไลด์ไปมา 1 นาที ดูแผ่นสไลด์ในที่มีแสงสว่างด้านบนพื้นด้านหลังเป็นสีดำ ถ้าเป็น *Salmonella* จะมีตะกอนไม่ว่าขนาดใดๆ เกิดขึ้นในช่อง antiserum O และไม่มีตะกอนในช่วงที่ใช้น้ำเกลือ

ตารางที่ 2 แสดงการตรวจ *Salmonella* ที่เป็นบวกได้ผลตามนี้

ปฏิกิริยา	TSI			LIA			CA	MR	VP	PR	Indole
	slant	butt	H ₂ S	slant	butt	H ₂ S					
	K	A	+/-	K	K	+					
การเปลี่ยนแปลง	สีแดง	สีเหลือง	เกิดฟองหรือไม่เกิดฟอง	สีม่วงไม่เปลี่ยน	สีม่วงไม่เปลี่ยน	เกิดฟอง	สีเขียวเป็นสีน้ำเงิน	สีแดง	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	สีเหลืองที่ชั้นผิว

K = alkaline, A = acid, + positive, - negative

* *S. arizonae* ให้สีเหลือง

ตรวจเชื้อ *Salmonella* ต่อถ้า TSI ให้ผลบวกไม่ว่า LIA ให้ผลบวกหรือลบ ถ้า LIA ให้ผลบวกแต่ TSI ให้ผลลบก็ให้ตรวจ *Salmonella* ต่อเช่นกัน

การตรวจวิเคราะห์เชื้อยีสต์และรา

อุปกรณ์

1. ปิเปต 1.0 มิลลิลิตร ที่มีขีดแบ่งปริมาตรละเอียด 0.1 มิลลิลิตร
2. ลูกยางหรือปั๊มดูด
3. เครื่องนับจำนวนโคโลนี
4. เครื่องปั่นความเร็วสูง
5. vortex mixer
6. ตู้บ่ม อุณหภูมิ 22-25°C
7. เข็มเขี่ยปลอดเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Potato Dextrose Agar
2. Plate Count Agar
3. Malt agar

4. Phosphate Buffer
5. Peptone 0.1 %
6. 10 % Tartaric acid ที่ปลอดเชื้อ

วิธีการ

1. เตรียมตัวอย่างอาหารและทำการเจือจางตามวิธีการข้างต้น
2. ทำการเพาะเชื้อแต่ละระดับการเจือจางเป็น 3 จาน ใช้ปิเปตดูดอาหารแต่ละความเจือจางโดยเลือกจากตัวอย่างที่เจือจางมากใส่ในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารละลาย tartaric acid หรือสารปฏิชีวนะประมาณ 15-20 มิลลิลิตร เทเข้าจานโดยหมุนตามเข็มนาฬิกา ต้องระวังอย่าให้อาหารล้นออกมา เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างแห้งติดจานเพาะเชื้อ และเพื่อป้องกันการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ ควรกำหนดระยะเวลาระหว่างการทำให้อาหารเจือจาง ในครั้งแรกจนถึงการเทอาหารเลี้ยงเชื้อจานสุดท้ายไม่เกิน 20 นาที ถ้าใช้สารปฏิชีวนะ อาหารเลี้ยงเชื้อควรเป็น plate count agar หรือ malt agar

ถ้าใช้กรดปรับ อาหารเลี้ยงเชื้อควรเป็น potato dextrose agar หรือ malt agar

3. บ่มจานเพาะเชื้อในที่มืดที่ 22-25 °C ห้ามซ้อนจานเพาะเชื้อสูงเกิน 3 จาน และไม่คว่ำจานเพาะ ห้ามแตะต้องจนกว่าจะนำออกมานับ
4. หลังจากบ่มเชื้อครบ 5 วัน นำออกมานับจำนวน ห้ามนับจำนวนหลังจาก 3 วัน เพราะสปอร์อาจงอกเพิ่มเมื่อครบ 5 วัน ทำให้ผลที่อ่านไม่ถูกต้อง การนับจำนวนโคโลนีจากจานที่มีเชื้อประมาณ 10-150 โคโลนี ถ้าส่วนใหญ่เป็นยีสต์ให้นับจำนวนโคโลนีในจานที่มีประมาณ 150 โคโลนี อย่างไรก็ตามมีเชื้อราอยู่มากก็อาจต้องลดช่วงโคโลนีสูงสุดต่อจานลงมาเพื่อให้นับได้ การรายงานผลเป็น CFU/g หรือ ml โดยดูจากค่าเฉลี่ยของการนับตัวอย่างชุดที่อยู่ในช่วงที่กำหนดไว้จากทั้ง 3 จานเพาะเชื้อ

การวิเคราะห์อาหารทางเคมี

การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ภาชนะอลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น
2. ตู้อบไฟฟ้า
3. ตู้อัดความชื้น
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด 0.0001 กรัม

วิธีการ

1. นำภาชนะอลูมิเนียมสำหรับหาความชื้นอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 °C นาน 2-3 ชั่วโมง แล้วนำออกจากตู้อบใส่ไว้ในตู้อัดความชื้น จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะถึงอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนัก
2. ทำซ้ำเช่นเดิม จนผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกัน ไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1-3 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักแล้ว
4. อบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 °C นาน 5-6 ชั่วโมง
5. นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในตู้อัดความชื้น จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะถึงอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนัก
6. อบซ้ำอีกครั้งละประมาณ 30 นาที ทำซ้ำเช่นเดิม จนผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกัน ไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

7. คำนวณปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้นคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์ย่อยโปรตีน ประกอบด้วยขวดย่อย (Kjeldahl flask) ขนาด 250-300 มิลลิลิตร และเตา (heating mantle) ดังแสดงในภาพที่ 11ก
2. อุปกรณ์ย่อยโปรตีน (semi-microdistillation apparatus) ดังแสดงในภาพที่ 11ข
3. ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร และขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
4. บีเปต 5 และ 10 มิลลิลิตร
5. บิวเรตต์ขนาด 25 มิลลิลิตร
6. ลูกแก้ว
7. กระดาษกรอง
8. เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด
9. สารผสมระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟตและโพแทสเซียมซัลเฟต อัตราส่วน 1:10
10. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น
11. โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 60 %
12. กรดบอริกที่มีความเข้มข้น 4%
13. กรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล
14. อินดิเคเตอร์ ซึ่งเป็นสารผสมระหว่าง methyl red และ bromocresol green

วิธีการ

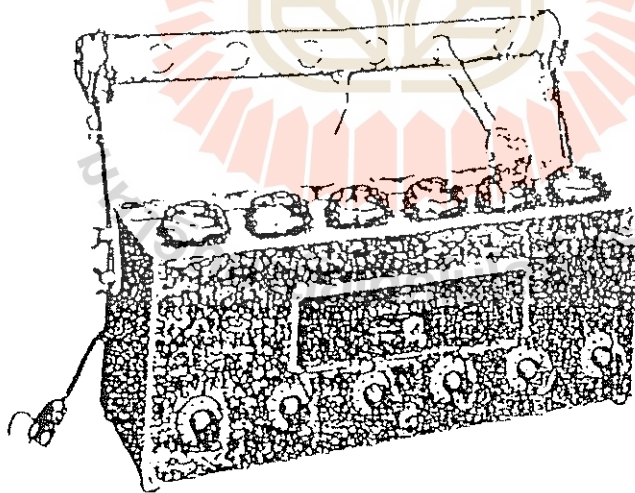
1. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 0.5-1 กรัม ห่อให้มิดชิดใส่ลงในขวดย่อยโปรตีน
2. ใส่สารผสมระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟตและโพแทสเซียมซัลเฟต 5 กรัม
3. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 25 มิลลิลิตร
4. ใส่ลูกแก้ว 3-4 ลูก กันกระแทกเวลาย่อย
5. ย่อยบนเตาจนกระทั่งได้สารละลายใส
6. ปลดยทิ้งให้เย็น
7. เติมน้ำกลั่นร้อนประมาณ 150 มิลลิลิตร ลงไปล้างบริเวณคอขวดให้ทั่ว
8. ย่อยอีกครั้งจนได้สารละลายใส
9. จัดอุปกรณ์กลับ แล้วเปิดสวิตช์ไฟและเปิดน้ำหล่อเย็นเครื่องควบแน่นด้วย
10. ใช้ Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุ กรดบอริกที่มีความเข้มข้น 4% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ซึ่งเติมอินดิเคเตอร์แล้ว ไปรองรับของเหลวที่จะกลั่นโดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลายกรดนี้

11. เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 มิลลิลิตร
12. กลั่นประมาณ 10 นาที(ปริมาตร 75-100 มิลลิลิตร) ล้างปลายอุปกรณ์ควบแน่นด้วยน้ำกลั่นลงในขวดรองรับ
13. ไตเตรทสารละลายที่กลั่นได้กับกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล สีของสารละลายจะเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีม่วง
14. ทำ blank และปฏิบัติตามข้อ 1-13
15. คำนวณปริมาณโปรตีนจากสูตร

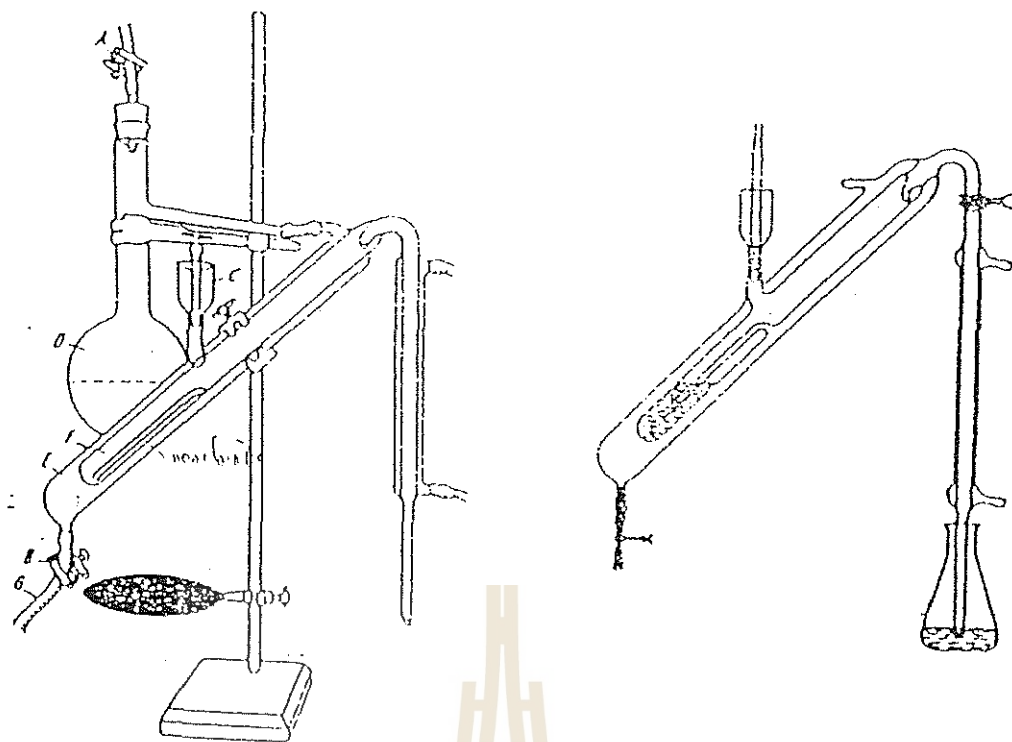
ปริมาณโปรตีนคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก= $\frac{(A-B) \times N \times 14.007 \times F}{W}$

W

- A = ปริมาตรกรดที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มล.)
- B = ปริมาตรกรดที่ใช้ไตเตรทกับblank (มล.)
- N = ความเข้มข้นของกรด (นอร์มอล)
- F = แฟกเตอร์ (แฟกเตอร์ที่ใช้คำนวณหาปริมาณโปรตีน สำหรับข้าวเจ้าและผลิตภัณฑ์ คือ 5.95)
- W = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น



ภาพที่ 9ก อุปกรณ์การย่อยโปรตีน



ภาพที่ ๑๒ อุปกรณ์การกลั่นหาปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลส

อุปกรณ์และสารเคมี

1. กรดอะซีติกความเข้มข้น 1 โมลาร์
2. สารละลายไอโอดีน
3. สารละลายมาตรฐานอะไมโลส (Potato amylose MW=100,000)
4. สารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ 95%
5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์
6. โพแทสเซียมไอโอไดด์
7. UV-visible spectrophotometer
8. ปิเปตขนาด 1.0, 5.0 มิลลิลิตร
9. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร
10. กระบอกตวง
11. water bath อุณหภูมิ 100°C

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายกรดอะซีติกความเข้มข้น 1 โมลาร์

ตวงกรดอะซีติกเข้มข้นปริมาตร 57.45 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

2. สารละลายไอโอดีน

ซึ่งไอโอดีน 0.2000 กรัม และโพแทสเซียมไอโอไดด์ 2.0000 กรัม ผสมให้เข้ากัน ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ซึ่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40.82 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

4. สารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ 95%

ดวงเอทิลแอลกอฮอล์สมบูรณ์จำนวน 95 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

5. สารละลายมาตรฐานอะไมโลส

ซึ่งอะไมโลส 0.0400 กรัม เติมสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ 95% จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จำนวน 9 มิลลิลิตร (ระวังอย่าให้อะไมโลสติดข้างขวด) นำไปแช่ในน้ำเดือด 10 นาที ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

การเตรียม calibration curve

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานอะไมโลสจำนวน 1,2,3,4 และ 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับ
2. เติมน้ำกลั่นลงในแต่ละขวด 70 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลายกรดอะซีติกความเข้มข้น 1 โมลาร์ จำนวน 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ
3. เติมสารละลายไอโอดีนลงในแต่ละขวด 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นจะได้สารละลายมาตรฐานอะไมโลสซึ่งเทียบเท่ากับปริมาณอะไมโลสในสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นร้อยละ 8, 16, 24, 32 และ 41 ตามลำดับ เขย่าและตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 20 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอะไมโลส

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่างแป้ง 0.1000 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ
2. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จำนวน 9 มิลลิลิตร นำไปแช่ในน้ำเดือด 10 นาที ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของอะไมโลสในสารละลายตัวอย่าง

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้จำนวน 5 มิลลิลิตร กรณีทำ blank ใช้ น้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง
2. เติมน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร สารละลายกรดอะซีติกความเข้มข้น 1 โมลาร์ จำนวน 1 มิลลิลิตร สารละลายไอโอดีน 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าและตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 20 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นของอะไมโลสในตัวอย่างแบ่งจากกราฟมาตรฐาน

วิธีการ

1. เทสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.3% จำนวน 10 มิลลิลิตรลงใน flask A และ เติมอินดิเคเตอร์ผสม ไตรเตตรด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.01 นอร์มอล จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเขียว
2. ใส่ตัวอย่างแบ่ง 20 กรัมและน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรลงใน flask B เติมเอทานอล 2 มิลลิลิตร แล้วเติม silicon oil 2 หยดเพื่อกำจัดฟอง เติมสารละลายกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 25% จำนวน 20 มิลลิลิตร และประกอบ flask B เข้ากับอุปกรณ์การวิเคราะห์ทันที
3. ผ่านก๊าซไนโตรเจนจากตำแหน่ง G ด้วยอัตราเร็ว 0.5-0.6 ml/min ปรับความแรงเปลวไฟของ micro burner เพื่อป้องกันสารละลายแบ่งไหม้ หลังจากเป็นเจลแบ่งเปียกแล้ว(ประมาณ 15 นาที) ให้ความร้อนต่ออีก 30 นาที
4. นำ flask A ออก และล้างคราบที่ติดอยู่ปลายหลอดแก้วด้วยน้ำกลั่นลงใน flask A
5. ไตรเตตรสารละลายใน flask A ด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.01 นอร์มอล จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเขียว

สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.01 นอร์มอล จำนวน 1 มิลลิลิตร = ชัลไฟด์ 320 ไมโครกรัม



สรุปผลการปฏิบัติงาน

การปฏิบัติงานในตำแหน่งเจ้าหน้าที่ฝ่ายควบคุมคุณภาพในห้องปฏิบัติการ ทำให้มีโอกาสได้ศึกษาการตรวจคุณภาพข้าวสาร แป้งข้าว ในรายละเอียดด้านการเก็บตัวอย่าง วิธีการตรวจสอบ การใช้เครื่องมือตรวจสอบ specification ของแป้ง และได้เรียนรู้วิธีการผลิตแป้งในสายการผลิต รวมทั้งการตรวจสอบคุณภาพแป้งส่งออกพร้อมกับเจ้าหน้าที่ชาวญี่ปุ่น จึงได้ทราบเทคนิคต่างๆเพิ่มขึ้น และยังได้รับมอบหมายให้ทำการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ ความหนืดและปริมาณอะไมโลสในตัวอย่างแป้งชนิดต่างๆ ซึ่งได้นำความรู้ที่ได้ศึกษามาใช้ประโยชน์ได้ นอกจากนี้ได้ค้นคว้าข้อมูลทางด้านการทำความสะอาดโรงงานและการวิเคราะห์แป้งและข้าวทางจุลชีววิทยาและทางเคมีเพื่อเสนอรายงานต่อ Job supervisor จากการปฏิบัติงานตลอดระยะเวลา 3 เดือนทำให้ได้ประสบการณ์ในการทำงานเพิ่มขึ้น



เอกสารอ้างอิง

- กนกอร อินทราพิเชฐ. 2541. เอกสารประกอบการสอนรายวิชาการวิเคราะห์อาหารทางเคมี. สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ปิยวรรณ กาสลัก. 2539. เอกสารประกอบการสอนวิชาปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร. สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- วรรณา ตั้งเจริญชัย. 2538. ปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม. สำนักพิมพ์รั้วเขียว, กรุงเทพฯ.
- ศิวาพร ศิวเวชช. 2536. การสุขาภิบาลโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1997. Official Methods of Analysis of the AOAC International. AOAC, Washington D. C. USA.
- Gould, W. A. 1994. CGMP's/ Food Plant Sanitation. CIT Publications Inc., Maryland. USA.
- Marriott, N. G. 1994. Principles of Food Sanitation. Chapman & Hall Inc., New York. USA.
- Shapton, D. A. and N. F. 1993. Principles and Practices for the Safe Processing of Foods. Butter Worth-Heinemann Limited, Oxford. Great Britain.
- Troller, J. A. 1993. Sanitation in Food Processing. Academic Press Inc., California. USA.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์เชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Baird Parker Medium

Basal medium

Tryptone	10.0	g.
Beef extract	5.0	g.
Yeast extract	1.0	g.
Sodium pyruvate	10.0	g.
Glycine	12.0	g.
Lithium chloride.6H ₂ O	5.0	g.
Agar	20.0	g.
น้ำกลั่น	950	ml

ต้มสารละลายจนเดือด พร้อมทั้งกวนสม่ำเสมอเพื่อละลายส่วนผสม ถ่ายอาหาร 95 มิลลิลิตร ใส่ขวดจุกเกลียวหนึ่งมาเชื้อ 15 นาที ที่ 121°C pH ประมาณ 7.0 ± 0.2 ที่ 25°C หลังนำออกจากหม้อนึ่งสามารถเก็บได้ไม่เกิน 1 เดือนที่ $4 \pm 1^\circ\text{C}$ แต่ถ้าจะใช้อาหารนี้เลยทิ้งให้อุ่นหม้ออาหารเลี้ยงเชื้อ 48-50°C เขย่าให้เข้ากัน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ แล้วเท 15-18 มิลลิลิตรต่อจาน ทำให้อาหารแห้งก่อนใช้

Brain Heart Infusion (BHI) Broth

Calf brain infusion	200.0	g.
Beef heart infusion	250.0	g.
Proteose peptone หรือ gelysate	10.0	g.
NaCl	5.0	g.
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2.5	g.
Dextrose	2.0	g.
น้ำกลั่น	1.0	liter

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ให้ความร้อน ใส่หลอดหรือขวดหนึ่งมาเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที pH ประมาณ 7.4 ± 0.2

Brilliant Green Lactose Bile Broth, 2%

Peptone	10.0	g.
Lactose	10.0	g.
Oxgall	20.0	g.
Brilliant green	0.0133	g.
น้ำกลั่น	1.0	liter

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นโดยใช้ความร้อนไม่รุนแรง ใส่หลอดขนาด 20×150 มิลลิเมตร หลอดละประมาณ 10 มิลลิลิตร บรรจุหลอดขนาด 10×75 มิลลิเมตร ให้คว่ำอยู่ข้างในหลอด นึ่งฆ่าเชื้อ 15 นาที ที่ 121°C มี pH สุดท้าย 7.2 ± 0.2 ก่อนเปิดหม้อนึ่งต้องรอให้อุณหภูมิต่ำกว่า 75°C

Broth Base

Peptone from casein	5.0	g.
Peptone from meat	5.0	g.
Sodium chloride	5.0	g.
Calcium carbonate	10.0	g.
น้ำกลั่น	1.0	liter

ละลายส่วนผสม นึ่งฆ่าเชื้อ 15 นาที ที่ 121°C ตะกอนขาวของ CaCO_3 จะไม่มีผลต่อการทำหน้าที่ของอาหาร ระหว่างการเก็บรักษาอาหารเหลว เป็นเวลานาน CaCO_3 ละลายซึ่งจะมีผลทำให้ pH เพิ่มขึ้นเล็กน้อย

EC Broth

Pancreatic digest casein	20.0	g.
Bile salt mixture หรือ Bile salts No 3	15.0	g.
Lactose	5.0	g.
Dipotassium phosphate	4.0	g.
Potassium phosphate	1.5	g.
Sodium chloride	5.0	g.
น้ำกลั่น	1.0	liter

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ใส่หลอดขนาด 16×150 มิลลิเมตร หลอดละประมาณ 8 มิลลิลิตร บรรจุหลอดขนาด 10×750 มิลลิเมตร ให้คว่ำอยู่ข้างในเพื่อป้องกันการเกิด นึ่งฆ่าเชื้อ 15 นาที ที่ 121°C pH สุดท้าย ประมาณ 6.9 ± 0.2 (** ห้ามเปิดหม้อนึ่งก่อนอุณหภูมิต่ำกว่า 75°C)

Egg Yolk Tellurite Enrichment

ไข่ไข่ในสารละลาย HgCl_2 (1:100) อย่างน้อย 1 นาที ล้างด้วยน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตอกไข่แยกไข่แดงกับไข่ขาวด้วยวิธีปลอดเชื้อ

ผสมไข่แดงกับน้ำเกลือ 0.85% ซึ่งฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 3:7 ปั่นด้วยเครื่องปั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วที่ความเร็วสูงนาน 5 นาที

ผสมไข่แดงที่ตีได้ 50 มิลลิลิตรกับ potassium tellurite 1% ซึ่งกรองและฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C

Eosin Methylene-Blue Lactose Sucrose Agar (EMB)

Peptone	10.0	g.
Lactose	5.0	g.
Sucrose	5.0	g.
Dipotassium Phosphate	2.0	g.
Agar	13.0	g.

Eosin Y	0.4	g.
Methylene Blue	0.065	g.

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นให้ความร้อนเพื่อละลายวัน ใส่ขวดรูปชมพู่ นึ่งฆ่าเชื้อ 15 นาที ที่ 121°C
pH ประมาณ 7.1 ± 0.1

Koser's Citrate Broth

Sodium ammonium phosphate	1.5	g.
Sodium citrate	3.0	g.
Monopotassium phosphate	1.0	g.
Magnesium sulfate	0.2	g.
น้ำกลั่น	1.0	liter

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ถ่ายใส่หลอด หลอดละ 10 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อ 15 นาที ที่ 121°C pH ประมาณ 6.7 ± 0.2

Lauryl Sulfate Tryptose Broth (LST)

Tryptoseหรือ Trypticase (pancreatic digest of casein)	20.0	g.
Lactose	5.0	g.
Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	2.75	g.
Monopotassium phosphate (KH_2PO_4)	2.75	g.
Sodium chloride	5.0	g.
Sodium lauryl sulfate	0.1	g.
น้ำกลั่น	1.0	liter

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ใส่หลอดขนาด 20×150 มิลลิเมตร หลอดละประมาณ 10 มิลลิลิตร บรรจุหลอดขนาด
 10×75 มิลลิเมตร ให้คว่ำอยู่ข้างใน นึ่งฆ่าเชื้อ 15 นาที ที่ 121°C pH สุดท้าย 6.8 ± 0.2

Lysine Iron Agar

Peptone	5.0	g.
Yeast extract	3.0	g.
Glucose	1.0	g.
L-lysine	10.0	g.
Ferric ammonium citrate	0.5	g.
Sodium thiosulfate	0.04	g.
Bromocresol purple	0.02	g.
Agar	15.0	g.
น้ำกลั่น	1.0	liter

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ให้ความร้อนเพื่อให้ส่วนผสมละลาย ใส่หลอดฝาเกลียวขนาด 13×100 มิลลิเมตร หลอดละประมาณ 4 มิลลิเมตร นึ่งฆ่าเชื้อ 15 นาที ที่ 121°C แล้วปล่อยให้แข็งโดยวางเอียงให้ฐานสูงจากกัน (butt) หลอดละ 4 เซนติเมตร เอียง (slant) 2.5 เซนติเมตร pH สุดท้ายประมาณ 6.7 ± 0.2

Mannitol egg yolk-polymyxin agar

Peptone	10.0	g.
Meat extract	1.0	g.
D(-) mannitol	10.0	g.
NaCl	10.0	g.
Phenol red (สารละลาย)	0.025	g.
Agar	15.0	g.
น้ำกลั่น	900.0	ml

ละลายส่วนผสม ให้ความร้อนจนส่วนผสมละลายหมด ปรับ pH ประมาณ 7.2 ± 0.1 และแบ่งใส่ขวด 225 มิลลิเมตร นึ่งฆ่าเชื้อ 15 นาที ที่ 121°C ทำให้เย็นถึงอุณหภูมิ 50°C จึงเติม egg yolk emulsion 12.5 มิลลิเมตร และ polymyxin B 2.5 มิลลิเมตร ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่จานเลี้ยงเชื้อหลอดเชื้อขนาด 100×15 มิลลิเมตร ทิ้งให้เย็นแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องก่อนนำมาใช้

MR-VP Medium

Peptone	7.0	g.
Glucose	5.0	g.
Dipotassium phosphate	5.0	g.
น้ำกลั่น	1.0	liter

ละลายส่วนผสมในน้ำ นึ่งฆ่าเชื้อ 15 นาที ที่ 121°C pH สุดท้ายประมาณ 6.9 ± 0.2

Nitrate Broth

Beef extract	3.0	g.
Peptone	5.0	g.
Potassium nitrate	1.0	g.
น้ำกลั่น	1.0	liter

ปรับ pH 7.0 ± 0.1 ถ่ายใส่หลอดขนาด 125×16 มิลลิเมตร 5 มิลลิเมตร นึ่งฆ่าเชื้อ 15 นาที ที่ 121°C

Nutrient Agar Slant and Plate

Beef extract	3.0	g.
Peptone	5.0	g.
Agar	15.0	g.
น้ำกลั่น	1.0	liter

ปรับ pH 6.8 ± 0.1 ให้ความร้อนจนละลายหมด ถ่ายใส่หลอดขนาด 125×16 มิลลิเมตรที่มีฝาเกลียวปิด 6.5 มิลลิตร นึ่งฆ่าเชื้อ 15 นาที ที่ 121°C และเอียงหลอดจนกระทั่งวันแข็งตัว ในกรณีงานเพาะเชื้อแบ่งอาหารใส่ขวด $100-500$ มิลลิตร นึ่งฆ่าเชื้อ 15 นาที ที่ 121°C ทำให้เย็นจนถึง 50°C และถ่ายใส่จานปลอดเชื้อขนาด 100×15 มิลลิเมตร ปริมาตร 18-20 มิลลิตร ทิ้งให้อาหารแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องก่อนนำมาใช้

Nutrient Broth with Lysozyme

Beef extract	3.0	g.
Peptone	5.0	g.
น้ำกลั่น		

แบ่งสารละลาย 99 มิลลิตรใส่ในขวดและ นึ่งฆ่าเชื้อ 15 นาที ที่ 121°C ผสม 0.1% lysozyme 1 มิลลิตร ลงในอาหารเหลว 99 มิลลิตร pH 6.8 ± 0.1 ถ่ายอาหารที่เสร็จแล้ว 2.5 มิลลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อลงในหลอดขนาด 100×13 มิลลิเมตร

การเตรียมสารละลายไลโซไซม์

ละลาย lysozyme 0.1 กรัมลงใน 0.01 N HCl ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 65.0 มิลลิตร ต้ม 20 นาที และเติม 0.01 N HCl ให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิตร แล้วนำ lysozyme hydrochloric 0.1 กรัม เติมนลงในน้ำ 100 มิลลิตร ฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านเยื่อกรองที่มีขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร

Phenol Red Dextrose Broth

Proteose peptone	10.0	g.
NaCl	5.0	g.
Beef extract	1.0	g.
Phenol red (สารละลาย phenol red 25 % 72 มิลลิตร)	0.018	g.
Dextrose	5.0	g.
น้ำกลั่น	1.0	liter

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ถ่ายสาร 3.0 มิลลิตร ใส่หลอดแก้วขนาด 13×100 มิลลิเมตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 10 นาที pH สุดท้าย 7.4 ± 0.1

Plate Count Agar

Tryptone	5.0	g.
Yeast extract	2.5	g.
Dextrose	1.0	g.
Agar	15.0	g.
น้ำกลั่น	1.0	liter

ให้ความร้อนจนเดือดเพื่อละลายส่วนผสม แบ่งใส่หลอดหรือขวดรูปชมพู่ นึ่งฆ่าเชื้อ 15 นาที ที่ 121°C pH วัดครั้งสุดท้าย 7.0 ± 0.2 ก่อนใช้ให้เติมสารปฏิชีวนะ Chlortetracycline-HCl + Chloramphenicol 2 มิลลิตร ต่ออาหาร 100 มิลลิตร

Peptone water Diluent, 0.1%

Peptone	1.0	g.
น้ำกลั่น	1.0	liter

ละลาย peptone ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.0 ± 0.1 ถ่ายใส่ขวดหรือหลอดที่จะทำการเจือจาง โดยเมื่อปริมาตรที่เจือจางระหว่างการฆ่าเชื้อ ฆ่าเชื้อ 15 นาที ที่ 121°C

Phenol Red Lactose Broth

Trypticase หรือ proteose peptone No 3	10.0	g.
NaCl	5.0	g.
Beef extract (optinal)	1.0	g.
Phenol red (สารละลาย phenol red 25 % 72 มิลลิลิตร)	0.018	g.
Lactose	10.0	g.
น้ำกลั่น	1.0	liter

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ถ่ายสาร 2.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดแก้วขนาด 13×100 มิลลิเมตร ซึ่งมีหลอดเก็บแก๊สขนาด 6×50 มิลลิเมตร คว่ำปากบรรจุไว้ นึ่งฆ่าเชื้อที่ 118°C นาน 10 นาที pH สุดท้าย 7.4 ± 0.2

Potato Dextrose Agar

Potato dextrose infusion from	4.0	g.
Dextrose	20.0	g.
Agar	15.0	g.
น้ำกลั่น	1.0	liter

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นให้ความร้อนโดยกวนเป็นครั้งคราวจนเดือดเพื่อให้ส่วนผสมละลาย ถ่ายใส่ขวดขนาด 250 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที อุ่นในอ่างน้ำอุ่นให้ได้อุณหภูมิ $45-50^\circ\text{C}$ ปรับให้เป็นกรดด้วย Tartaric 10% ซึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ pH 3.5 (ใช้กรดประมาณ 1.8 มิลลิลิตร ต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร)

Rambach Agar

Peptone	5.0	g.
Yeast extract	2.0	g.
Meat extract	1.0	g.
Sodium chloride	5.0	g.
Sodium deoxycholate	1.0	g.
Chromogenic mix	1.5(ampoule)	
Propylene glycol	10.5	g.
Agar	15.0	g.

เติม liquid mix 1หลอดในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร คนให้ละลายเข้ากันแล้วจึงเติมสารอาหารผง กวนให้ละลายเข้ากันหมด ให้ความร้อนอาหารจนเดือด คนให้อาหารละลายหมด ห้ามนึ่งฆ่าเชื้อ ทำให้อาหารเย็นลงแล้วคนก่อนที่จะเทอาหารลงใน

จาน อาหารที่เทลงจานแล้วสามารถเก็บไว้ในที่เย็นและมืดได้นาน 7 วัน หรือถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจะเก็บได้ 12 ชั่วโมง(*
อาหารสำเร็จรูปจาก Merck)

Selective Supplement*

Potassium tetrathionate	0.2	g.
Ox bile	0.08	g.
Brilliant green	0.0007	g.
Calcium carbonate	0.1	g.

ส่วนผสมนี้สำหรับ broth base 10 มิลลิลิตร

(*สารสำเร็จรูปเป็นเม็ดจากบริษัท Merck)

Simmon's Citrate Agar

Sodium citrate 2H ₂ O	2.0	g.
Sodium chloride	5.0	g.
K ₂ HPO ₄	1.0	g.
NH ₄ H ₂ PO ₄	1.0	g.
MgSO ₄	0.2	g.
Bromthymol blue	0.08	g.
Agar	15.0	g.
น้ำกลั่น	1.0	liter

ละลายส่วนผสมในน้ำโดยให้ความร้อนเป็นครั้งคราว ปลดปล่อยไอน้ำ 1-2 นาที จนส่วนผสมละลายหมด ถ่ายใส่หลอดฝา
เกลียวขนาด 13×100 มิลลิเมตร หรือ 16×150 มิลลิเมตร ให้ได้ 1/3 หลอด นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที ก่อนอาหารจะ
แข็งให้เอียงหลอดเพื่อให้ผิวหน้ายาว 4-5 เซนติเมตร และมีอาหารที่ก้นหลอดถึง 2-3 เซนติเมตร pH สุดท้าย 6.9±0.2

Triple Sugar Iron Agar

*Trypticase(pancreatic digest of casein)	10.0	g.
*Thitone (peptic digest of animal tissue)	10.0	g.
Lactose	10.0	g.
Sucrose	10.0	g.
Glucose	1.0	g.
Sodium chloride	5.0	g.
Ferrous ammonium sulfate 6 H ₂ O	0.2	g.
Sodium thiosulfate	0.2	g.
Phenol red	0.025	g.
Agar	13.0	g.
น้ำกลั่น	1.0	liter

*Polypeptone 20.0 g. นำมาใช้แทน Trypticase และ Thiotone

หรือ

Beef extract	3.0	g.
Yeast extract	3.0	g.
Peptone	15.0	g.
Proteose peptone	5.0	g.
Lactose	10.0	g.
Sucrose	10.0	g.
Dextrose	1.0	g.
Sodium chloride	5.0	g.
Sodium thiosulfate	0.3	g.
Agar	12.0	g.
Phenol Red	0.024	g.
น้ำกลั่น	1.0	liter

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นให้ความร้อนจนอุ่นละลายหมด ถ่ายใส่หลอดฝาเกลียวขนาด 13×100 มิลลิเมตร ทำให้เย็นโดยการ slant และ butt มี pH ประมาณ 7.4 ± 0.2

Tryptone Broth, 1%

Tryptone หรือ trypticase	10.0	g.
น้ำกลั่น	1.0	liter

ละลาย tryptone ในน้ำกลั่น ถ่ายสารละลายใส่หลอดขนาด 16×150 มิลลิเมตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที pH สุดท้าย 6.9 ± 0.2

Violet Red Bile Agar (VRBA)

Yeast extract	3.0	g.
Peptone หรือ Gelysate	7.0	g.
Sodium chloride	5.0	g.
Bile salts หรือ Bile salts No. 3	1.5	g.
Lactose	10.0	g.
Neutral red	0.03	g.
Crystal violet	0.002	g.
Agar	15.0	g.
น้ำกลั่น	1.0	liter

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ตั้งไว้ 3-4 นาที ผสมให้เข้ากันแล้วปรับ pH ให้ได้ 7.4 ± 0.2 ให้ความร้อนจนเดือด นาน 2 นาที พร้อมคนตลอดเวลา ห้ามนิ่งมาเชื้อ

Voges-Proskauer (VP) Broth

Peptone	7.0	g.
Glucose	5.0	g.
Dipotassium phosphate	5.0	g.
น้ำกลั่น	1.0	liter

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที pH สุดท้าย 6.9 ± 0.2
 สารเคมี

Acetic Acid, 5N

Glacial acetic acid	28.75	g.
น้ำกลั่น	71.25	ml.

Bromthymol Blue, 0.04%

Bromthymol Blue	0.2	g.
0.01 N NaOH	32.0	mol
น้ำกลั่น	500.0	ml

ละลาย bromthymol blue ใน NaOH แล้วเติมน้ำกลั่น

Coagulase Plasma

- Desiccated coagulase plasma (rabbit) with EDTA : เตรียมตามวิธีของผู้ผลิต
- ถ้าหา plasma ที่มี EDTA ไม่ได้ ให้ผสม dessicated rabbit plasma กับน้ำ แล้วเติม $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ ให้ได้ความเข้มข้น 0.1%

Gram's staining

- Crystal violet

Solution A;

Crystal violet	2.0	g.
Ethyl alcohol 95%	20.0	ml.

ละลายจนสีละลายหมด

Solution B;

Ammonium oxalate	0.8	g.
น้ำกลั่น	80.0	ml.

ผสมสารละลาย A กับ B เข้าด้วยกันแล้วกรอง

- Safranin O (Stock solution)

Safranin O	2.5	g.
------------	-----	----

Ethyl alcohol 95 %	100.0	ml.
--------------------	-------	-----

ละลายสีแล้วกรอง ก่อนนำไปใช้ให้เจือจางเป็น 10 เท่า

3) Gram's iodine solution

Iodine	1.0	g.
Potassium iodine	2.0	g.
น้ำกลั่น	300.0	ml.

ละลาย iodine และ potassium iodide ในน้ำกลั่นเพียงเล็กน้อยก่อน แล้วจึงเติมน้ำให้ครบ 300 มิลลิลิตรเก็บในขวดสี

ชา

Kovacs' Reagent

p-Dimethylaminobenzaldehyde	5.0	g.
Amyl alcohol	75.0	g.
Hydrochloric acid (concentrated)	25.0	g.

ละลาย p-Dimethylaminobenzaldehyde และ Amyl alcohol ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 50-60°C นาน 5 นาที ขณะ
ปล่อยให้เย็นริน HCl ลงไป เขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชาและเก็บในตู้เย็น

Methyl Red Indicator

Methyl red	0.01	g.
Ethanol, 95%	300.0	ml.
น้ำกลั่น	200.0	ml.

ละลาย Methyl red ใน แอลกอฮอล์ในขวดเตรียมสาร 500 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร

Nitrate Test Reagent

Reagent A: ละลายกรดซัลฟิวริก 8.0 กรัม ใน กรดอะซิติกความเข้มข้น 5 นอร์มอล ปริมาตร 1 ลิตร

Reagent B: ละลาย alpha-naphthol 23.0 กรัม ใน กรดอะซิติกความเข้มข้น 5 นอร์มอล ปริมาตร 1 ลิตร

Phosphate buffer solution (Bufferfield's Buffered Phosphate Diluent)

Stock solution :

Monosodium hydrogen phosphate	34.0	g.
น้ำกลั่น	500.0	ml.

ปรับ pH 7.2 ด้วย 1N NaOH (ประมาณ 175 มิลลิลิตร) แบ่งใส่ขวดหนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที เก็บในตู้เย็น

Working solution :

Stock solution	1.25	g.
น้ำกลั่น	1.0	liter

แบ่งเป็นส่วน ๆ หนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที

Potassium Hydroxide Solution, 40%

Potassium hydroxide

40.0 g.

น้ำกลั่น

100.0 ml.

ละลาย Potassium hydroxide ในน้ำกลั่นเก็บในขวดสีชา

Triton X-100™

สารนี้คือ Octylphenoxy polyethoxy ethanol ใช้เป็น wetting agent และ emulsifier จัดจำหน่ายโดย บริษัท Fisher Scientific Co.



ภาคผนวก ข
ตาราง MPN

ตารางที่ 1 MPN Index ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % สำหรับการทดลองที่ใช้ระบบ 3 และ 5 หลอดที่ระดับความเจือจางเดียวกัน ซึ่งให้ผลเป็นบวก (0.1, 0.01, 0.001 g.)

จำนวนหลอดที่ ให้ผลบวก	Tubes per Dilution					
	3			5		
	ระดับความเชื่อมั่น 95%			ระดับความเชื่อมั่น 95%		
	MPN Index/g	Lower	Upper	MPN Index/g	Lower	Upper
0-0-0	<3			2		
0-0-1	3	<0.5	9	2	<0.5	7
0-1-0	3	<0.5	13	2	<0.5	7
0-2-0	-			4	<0.5	11
1-0-0	4	<0.5	20	2	<0.5	7
1-0-1	7	1	21	4	<0.5	11
1-1-0	7	1	23	4	<0.5	11
1-1-1	11	3	36	6	<0.5	15
1-2-0	11	3	36	6	<0.5	15
2-0-0	9	1	36	5	<0.5	13
2-0-1	14	3	37	7	1	17
2-1-0	15	3	44	7	1	17
2-1-1	20	7	89	9	2	21
2-2-0	21	4	47	9	2	21
2-2-1	28	10	150	-		
2-3-0	-			12	3	28

จำนวนหลอดที่ ให้ผลบวก	Tubes per Dilution					
	3			5		
	ระดับความเชื่อมั่น 95%			ระดับความเชื่อมั่น 95%		
	MPN Index/g	Lower	Upper	MPN Index/g	Lower	Upper
3-0-0	23	4	120	8	1	19
3-0-1	39	7	130	11	2	25
3-0-2	64	15	380	-		
3-1-0	43	7	210	11	2	25
3-1-1	75	14	230	14	4	34
3-1-2	120	30	380	-		
3-2-0	93	15	380	14	4	34
3-2-1	150	30	440	17	5	46
3-2-2	210	35	470	-		
3-3-0	240	36	1,300	-		
3-3-1	460	71	2,400	-		
3-3-2	1,100	150	4,800	-		
3-3-3	2,400			-		
4-0-0	-			13	3	31
4-0-1	-			17	5	46
4-1-0	-			17	5	46
4-1-1	-			21	7	63
4-1-2	-			26	9	78

จำนวนหลอดที่ ให้ผลบวก	Tubes per Dilution					
	3			5		
	ระดับความเชื่อมั่น 95%			ระดับความเชื่อมั่น 95%		
	MPN Index/g	Lower	Upper	MPN Index/g	Lower	Upper
4-2-0	-			22	7	67
4-2-1	-			26	9	78
4-3-0	-			27	9	80
4-3-1	-			33	11	93
4-4-0	-			34	12	93
5-0-0	-			23	7	70
5-0-1	-			31	11	89
5-0-2	-			43	15	110
5-1-0	-			33	11	93
5-1-1	-			46	16	120
5-1-2	-			63	21	150
5-2-0	-			49	17	130
5-2-1	-			70	23	170
5-2-2	-			94	28	220
5-3-0	-			79	25	190
5-3-1	-			110	31	250
5-3-2	-			140	37	340

จำนวนหลอดที่ ให้ผลบวก	Tubes per Dilution					
	3			5		
	ระดับความเชื่อมั่น 95%			ระดับความเชื่อมั่น 95%		
	MPN Index/g	Lower	Upper	MPN Index/g	Lower	Upper
5-3-3	-			180	44	500
5-4-0	-			130	35	300
5-4-1	-			170	43	490
5-4-2	-			220	57	700
5-4-3	-			280	90	850
5-4-4	-			350	120	1,000
5-5-0	-			240	68	750
5-5-1	-			350	120	1,000
5-5-2	-			540	180	1,400
5-5-3	-			920	300	3,200
5-5-4	-			1,600	640	5,800
5-5-5	-			2,400		

ภาคผนวก ค
การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมและหาความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายกรดเกลือเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

วิธีเตรียม

ตวงกรดเกลือเข้มข้นปริมาณ 9 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 1 ลิตร ซึ่งมีน้ำกลั่นบรรจุอยู่บ้าง แล้วเติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ได้เป็นสารละลายกรดเกลือเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

วิธีหาความเข้มข้นมาตรฐาน

ชั่งโซเดียมเตตราโบเรต (Borax : $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) ให้ได้น้ำหนักแน่นอน 0.4 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพูนขนาด 250 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 50 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 3 ขวด แต่ละขวดเติมเมทิลเรด 2-3 หยด แล้วไทเทรตกับสารละลายกรดเกลือที่เตรียมไว้ สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูที่จุดยุติ คำนวณความเข้มข้นที่แน่นอนของกรดเกลือได้จาก

ความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือ = $\frac{\text{น้ำหนักของโซเดียมเตตราโบเรต (กรัม)}}{\text{ปริมาตรสารละลายกรดเกลือที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร)} \times 0.1907}$

(นอร์มอล)

ปริมาตรสารละลายกรดเกลือที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร) $\times 0.1907$

(สมมูลของโซเดียมเตตราโบเรต = 190.72)

2. การเตรียมและหาความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล

วิธีเตรียม

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ เอ อาร์ เกรด ปริมาณ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร เก็บสารละลายต่างในขวดแก้วซึ่งฝาปิดที่ใช้ต้องไม่ใช้แก้ว

วิธีหาความเข้มข้นมาตรฐาน

1. อาจใช้วิธีไทเทรตสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์กับสารละลายกรดเกลือที่มีความเข้มข้นเดียวกันซึ่งผ่านการปรับมาตรฐานแล้ว โดยปิเปตสารละลายต่างปริมาณ 25 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ ไทเทรตด้วยสารละลายกรดจากบิวเรตต์ มีฟีนอล์ฟทาไลน์เป็นอินดิเคเตอร์ แล้วคำนวณจาก $N_1V_1 = N_2V_2$

N_1 = ความเข้มข้นกรด (นอร์มอล)

V_1 = ปริมาตรกรด (มิลลิลิตร)

N_2 = ความเข้มข้นด่าง (นอร์มอล)

V_2 = ปริมาตรด่าง (มิลลิลิตร)

2. วิธีที่จะได้ค่าถูกต้องแน่นอนกว่าคือการใช้โพแทสเซียมเฮกซะฟลูออโรทาเลท ซึ่งทำได้โดยอบโพแทสเซียมเฮกซะฟลูออโรทาเลทใส่กระชกนาฬิกาในตู้อบไฟฟ้าอุณหภูมิ 110°C นาน 1-2 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น ซึ่งให้น้ำหนักที่แน่นอน 0.8 กรัม ใส่ลงในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากคาร์บอนเนต ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 3 ขวด แล้วไทเทรตกับสารละลายต่างข้างต้น มีฟีนอล์ฟทาไลน์เป็นอินดิเคเตอร์ คำนวณความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้จาก

ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ = $\frac{\text{น้ำหนักโพแทสเซียมเฮกซะฟลูออโรทาเลท (กรัม)}}{\text{ปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร)} \times 0.2042}$

(นอร์มอล)

ปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร) $\times 0.2042$

(สมมูลของโพแทสเซียมเฮกซะฟลูออโรทาเลท = 204.216)

3. การเตรียมอินดิเคเตอร์ผสมสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน
- ชั่ง 0.125 กรัม เมทิลเรด และ 0.082 กรัม เมทิลีนบลู ละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ปริมาณ 100 มิลลิลิตร
 - ชั่ง 0.1 กรัม โบรโมครีซอลกรีน ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
 - ผสมสารละลายจากข้อ 1 และ 2 ในอัตราส่วน 5:1

