ภาคผนวก ก

การวิธีวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

1. การวิเคราะห์ปริมาณสิ่งแปลกปลอม (AOAC, 2000)

วัสดุ อุปกรณ์

1. ตะแกรงเบอร์ 8 mesh,เบอร์ 120 mesh และเบอร์ 140 mesh
2. ฟลาสก์ชุดกรอง
3. แว่นขยาย ขนาด 30 x 60 เท่า

สารเคมี Heptane

วิธีการ

1. นำตัวอย่างประมาณ 1 กิโลกรัม วางบนตะแกรงเบอร์ 8 mesh ซึ่งวางอยู่ด้านบนของตะแกรงเบอร์ 120 mesh
2. ตรวจสอบตัวอย่างบนตะแกรงเบอร์ 8 mesh ด้วยสายตา ว่ามีสิ่งแปลกปลอมใดๆหรือไม่ (macroscopic filth)
3. ถ่ายสิ่งของที่ค้างอยู่บนตะแกรงเบอร์ 140 mesh ด้วยความระมัดระวังลงในฟลาสก์ชุดกรองโดยอาศัยน้ำ
4. แยกสิ่งแปลกปลอมออกโดยอาศัยสารละลาย Heptane ประมาณ 30 มิลลิลิตร แต่ถ้ามีปริมาณสิ่งแปลกปลอมเพียงเล็กน้อยอาจจะแยกออกมาโดยใส่กระดาษกรองเลยก็ได้
5. ตรวจสอบลักษณะสิ่งแปลกปลอมโดยใช้แว่นขยาย ขนาด 30 x 60 เท่า หรือกล้องจุลทรรศน์ (microscopic filth)
6. รายงานผลการตรวจสอบปริมาณสิ่งแปลกปลอมทั้งแบบ macroscopic filth และ microscopic filth

2. การวิเคราะห์ค่า pH (AOAC, 2000)

วัสดุ อุปกรณ์

1. เครื่องวัดพีเอช
2. บีกเกอร์
3. กระดาษกรอง Whatman No.45
4. magnetic stirrer

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 5 กรัมใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปราศจากไอออน 45 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 1 นาที

2. กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.45

3. นำส่วนที่ผ่านการกรองไปวัดค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช

3. การวิเคราะห์ค่า a_w (AOAC, 2000)

วัสดุ อุปกรณ์

เครื่องวัดค่า Water activity

วิธีการทำงานของเครื่อง

1. การ Calibrate เครื่อง

- นำตลับ Salt standard (ความชื้นมาตรฐาน) ใส่ใน Measuring chamber ให้เริ่มต้นด้วย Salt standard ให้เริ่มต้นด้วย Salt standard SAL-90 (90.1% ERH)

- ปิดฝาครอบให้เรียบร้อย และหมุนปุ่มสีเหลืองไปยังหมายเลข 2 Calibrate รอประมาณ 1-2 นาที แล้วจึงค่อยกดปุ่ม Enter ด้านขวามือ กดจนกระทั่งบนจอ LCD กระพริบ ถ้าข้อความบนจออ่านว่า NO CAL ให้รอจนกว่าหน้าจอจะแสดงข้อความว่า 90 CAL พร้อมๆกับกระพริบด้วย

- ให้กดปุ่มสีฟ้า Enter อีกครั้งหรือจนกระทั่งข้อความบนจอหยุดกระพริบ เครื่องจะทำการ Calibrate จนเสร็จสิ้นกระบวนการ

- การ Calibrate ควรทำการการ Calibrate หลายๆค่าในคราวเดียวกันเป็นการเรียงลำดับ เริ่มต้นจากค่ามากถึงค่าน้อย อย่างน้อย 2 ค่า ที่สามารถครอบคลุมถึงค่า a_w ที่คาดว่าจะเป็นค่าของตัวอย่าง

- หลังจากเสร็จสิ้นการ Calibrate แล้ว เครื่องจะคืนสู่สภาพปกติพร้อมที่จะใช้งานและแสดงค่าอุณหภูมิ และ % ERH (a_w=ERH/100) ของตัวอย่าง

วิธีการใช้เครื่องเพื่อทำการวัดตัวอย่าง

- การเข้าสู่โปรแกรมเริ่มต้นที่ Drive C ให้พิมพ์คำว่า CD NOVASINA ตามด้วยกด Enter

- บนจอปรากฏข้อความ C: NOVASINA> แล้วพิมพ์ WAMS ตามด้วยกด Enter

- บนจอจะปรากฏเป็น Title แล้วตามด้วย Menu ของโปรแกรมในลำดับต่อมาเลือกที่ 1 Set formular constant ตามด้วยกด Enter เครื่องจะให้ใส่ชื่อ แฟ้ม ตามด้วยกด Enter

- กด Enter ผ่านไปเรื่อยๆ

- กดเลือกข้อ 2 Log data ตามด้วยกด Enter ให้เครื่องแสดงข้อมูลในรูปข้อความ เลือก Text เครื่องจะถามชื่อแฟ้มอีกครั้ง ใส่ชื่อเดิมเพื่อเป็นการยืนยัน ตามด้วยกด Enter

- เครื่องจะให้ข้อมูลอื่นๆ ถ้าไม่ต้องการให้กด Enter ผ่านไปทุกข้อ

- หมุนปุ่มสีเหลืองของเครื่องThermoconstanter ไปที่หมายเลข 1

- นำตลับพลาสติกใส่ตัวอย่างประมาณ 80-90%

- นำตลับตัวอย่างใส่ในพลาสติกมาใส่ Measuring chamber

- ปิดฝาChamber โดยหมุนตามเข็มและปิดฝาครอบ

- ตั้งอุณหภูมิที่ต้องการ เครื่องคอมพิวเตอร์ จะทบทวนสภาวะของการวัดค่าอีกครั้ง กด Enter ทุกข้อผ่านไป

- จากนั้นรอจนกระทั่งอุณหภูมิได้ตามที่ตั้งไว้ และRelative Humidity ของอากาศที่วัดไว้อยู่ในสภาวะสมดุลกับสารตัวอย่าง เมื่อค่า Relative Humidity หารด้วย 100 ก็จะได้ค่า a_w

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

1. การวิเคราะห์ค่าปริมาณเกลือ (AOAC, 2000)

วัสดุ อุปกรณ์

1. เครื่องโฮโมจิไนเซอร์
2. บีกเกอร์
3. บิวเรต
4. transfer pipette
5. flask
6. กระดาษกรอง Whatman No.1

สารเคมีและการเตรียม

1. สารละลาย $AgNO_3$ 0.1 N
2. กรดไนตริก
3. เฟอริกอินดิเคเตอร์
4. สารละลายแอมโมเนียมไธโอซัลเฟต (NH_4SCN) เข้มข้น 0.1 N

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างซึ่งปั่นละเอียด0.5 กรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เติม $AgNO_3$ 0.1 N ปริมาณ 35 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน

3. เติมกรดไนตริก 20 มิลลิลิตร ย่อยบนเตาในตู้ควัน 15 นาที รอจนเย็น

4. กรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร แล้วเติมเฟอริกอินดิเคเตอร์ 5 มิลลิลิตร

5. ไตเตรตด้วยสารละลายแอมโมเนียมไธโอซัลเฟต (NH_4SCN) เข้มข้น 0.1 N สังเกตจนสีเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคงตัว บันทึกผล

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเกลือ (ร้อยละ)} = \frac{0.0058\text{x}\text{ปริมาตร}0.1\text{N}AgNO_3\text{ที่เติม(ml)} - \text{ปริมาตร}0.1\text{N } NH_4SCN\text{ที่ใช้ไตเตรต(ml)x}100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง(กรัม)}}$$

2. การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดคิดเทียบเทียบกับกรดแลคติก (AOAC, 2000)

วัสดุ อุปกรณ์

1. เครื่องโฮโมจิไนเซอร์
2. บิวเรต
3. Volumetric flask Volumetric flask

สารเคมีและการเตรียม

1. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 N

การเตรียม โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N

- ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 34 กรัม
- ละลายในน้ำกลั่น1000 มิลลิลิตร

การเตรียม Standard sodium hydroxide titrant 0.1 N

- ปิเปต $KHC_8H_4O_4$ 0.05 N ปริมาณ 15 - 40 มิลลิลิตร ลงใน Volumetric flask
- หยดฟีนอล์ธาลีนที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ 2-3 หยดลงใน Volumetric flask เขย่าให้เข้ากัน
- ไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 N สังเกตจนสีเปลี่ยนแปลงจากเดิมเป็นสีชมพู บันทึกผล เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นที่แท้จริงของโซเดียมไฮดรอกไซด์

การคำนวณ

$$\text{Normality} = \frac{\text{ปริมาณเป็นกรัมของ}KHC_8H_4O_4\text{ที่ใช้ x ปริมาณ ml ของ }KHC_8H_4O_4}{204.2\text{ x ปริมาณ ml ของ NaOH ที่ใช้ไตเตรต}}$$

2. สารละลาย $KHC_8H_4O_4$ 0.05 N

การเตรียม Potassium hydrogen phthalate solution 0.05 N (0.05 N $KHC_8H_4O_4$)

- ชั่ง $KHC_8H_4O_4$ 15 - 20 กรัม อบที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วางให้เย็นในเดซิเคเตอร์ชั่งน้ำหนักสุดท้ายให้ได้ 10.0 $\pm$ 0.5 กรัม

- ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml จะได้ $KHC_8H_4O_4$ 0.05 N

3. ฟีนอล์ฟธาลีนอินดิเคเตอร์

- ชั่งฟีนอล์ฟธาลีน 0.1 กรัม

- ละลายในเอทธานอล 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างซึ่งปั่นละเอียดหนัก 5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตรเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer

2. ไตเตรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 N จนมีค่าพีเอชเท่ากับ 8.3

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแลคติก} = \frac{\text{โซเดียมไฮดรอกไซด์(มล)} \times N \times 90.09 \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง(กรัม)} \times 100}$$

3. การวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีน (AOAC, 2000)

วัสดุ อุปกรณ์

1. เครื่องโฮโมจิไนเซอร์
2. Volumetric flask
3. Volumetric pipette
4. Column
5. Spectrofluorometer

สารเคมีและการเตรียม

- 3.57 Phosphoric acid : ปิเปต 85% H_3PO_4 ปริมาณ 121.8 มิลลิลิตร และปรับปริมาตร ให้เป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

- 0.1 % O-phtalicdicarboxaldehyde (OPT) : ละลาย OPT 100 มิลลิกรัม ในเมทานอล 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิตู้เย็น เตรียมใหม่ทุกสัปดาห์

- สารละลายมาตรฐานฮีสตามีน โดยเตรียม

Stock solution 100 ppm as free base : ชั่ง Histamine dihydrochloride (Histamine 2HCl) จำนวน 0.1691 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย 0.1 N HCl เก็บในตู้เย็น ต้องเตรียมใหม่ทุกสัปดาห์

Intermediate solution 10 ppm : ปิเปต Stock solution ปริมาณ 1 มิลลิลิตรปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย 0.1 N HCl

Working solution 0.1, 0.2 และ 0.3 ppm : ปิเปต Intermediate solution ปริมาณ1, 2 และ 3 มิลลิลิตรปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย 0.1 N HCl

- Ion exchange resin เปลี่ยนเรซินให้อยู่ในรูป –OH โดยเติม 2 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาณ 15 มิลลิลิตร ต่อเรซิน 1 กรัม คนให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เทสารละลายด่างทิ้ง และแช่ซ้ำอีกครั้งจากนั้นจึงล้างเรซินด้วยน้ำกลั่นจนหมดด่าง นำไปบรรจุในคอลัมน์ซึ่งมีใยแก้วบรรจุอยู่โดยให้เรซินมีความสูงประมาณ 8 เซนติเมตร มีน้ำกลั่นอยู่เหนือเรซินตลอดเวลา ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 10 มิลลิลิตร ก่อนเติมสารสกัดตัวอย่าง

- 0.1 N HCl

- 1 N NaOH

วิธีเตรียมตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม

2. เติมเมทานอล ปริมาณ 25 มิลลิลิตร และ โฮโมจีไนซ์เป็นเวลา 2 นาที

3. กรองผ่านกระดาษกรอง(Whatman NO.1) ลงใน Volumetric flask ขนาด 5 มิลลิลิตร ล้างโฮโมจีไนซ์เซอร์ และภาชนะที่บรรจุตัวอย่างด้วย เมทานอล และกรองกระดาษกรอง

4. ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใน Water bath เป็นเวลา 15 นาที

5. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

6. กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1)

วิธีการ

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์และเติมน้ำกลั่น 4-5 มิลลิลิตร

2. ปล่อยให้สารละลายไหลผ่านคอลัมน์ลงสู่ Volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุ 1.0 N HCl ปริมาณ 5 มิลลิลิตร

3. เมื่อระดับของเหลวเหนือเรซินประมาณ 2 มิลลิเมตร เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และปล่อยให้ของเหลวไหลผ่านคอลัมน์ต่อจากนั้นเติมน้ำกลั่นลงสู่คอลัมน์จนกระทั่งสารละลายใน

Volumetric flask 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่นและเขย่าเพื่อให้สารละลายผสมกันดี

วิธีการตรวจสอบ

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask แล้วปิเปต 0.1 N HCl ปริมาณ 10 มิลลิลิตร และ1 N NaOH ปริมาณ 3 มิลลิลิตร

2. ปิเปตสารละลาย OPT ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ภายใน 5 นาที (ภายหลังการเติมกรดและด่างข้อ 1.) ผสมให้เข้ากันโดยทันที จับเวลา 4 นาที

3. เติม 3.57 H_3PO_4 ปริมาณ 3 มิลลิลิตรและผสมให้เข้ากันโดยทันที

4. นำไปวัดค่า Fluororescence intensity ภายใน 1.5 ชั่วโมง ที่ Excitation wavelength 350 nm และ Emission wavelength 444 nm

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

- ปิเปต Working solution ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วทำเช่นเดียวกับข้อ 1-4

การเตรียม Blank

- ปิเปตสารละลาย 0.1 N HCl ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 50 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง แล้วทำเช่นเดียวกับข้อ 1-4

การคำนวณ

$$\text{Histamine content(ppm)} = \frac{D \times 50 \times 50 \times 1}{M \times 5 \times 1 \times W}$$

เมื่อ D = Fluororescence intensity of sample

M = Average fluororescence intensity of standard concentration of 0.2 ppm

$$M = \frac{(A / 105) + B + 2C}{3}$$

A = Fluororescence intensity of 0.3 ppm

B = Fluororescence intensity of 0.2 ppm

C = Fluororescence intensity of 0.1 ppm

W = Weight of sample

การวิเคราะห์คุณภาพจุลินทรีย์

1. การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total viable Count) (BAM, 2002)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Platc count agar (PCA)
2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์(Phosphate buffer solution)

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 ชั่งตัวอย่างๆละ 10 กรัม ลงในขวดปลอดเชื้อ

1.2 เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 90 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วยความเร็วต่ำเป็นเวลา 1 นาทีนำไปตั้งทิ้งในตู้เย็น 30 นาที

1.3 ทำการเจือจางให้เป็น 1: 10, 1:100และ 1:1000 ตามลำดับโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

2. การตรวจนับจุลินทรีย์

2.1 ดูดตัวอย่างจากข้อ 1.3 อย่างละ 1 มิลลิลิตร (ทำ 2 ซ้ำ) ลงในจานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

2.2 เติม PCA ประมาณ 15 มิลลิลิตร

2.3 เขย่าจานเพาะเชื้อเบาๆแล้วตั้งทิ้งไว้ให้วุ้ยแข็งตัวประมาณ 15 นาที

2.4 อบเพาะเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส ในลักษณะคว่ำจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.5 ตรวจนับจุลินทรีย์จากจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนประมาณ 30-300 โคโลนี บันทึกผลและรายงานผลการทดลองเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัมตัวอย่าง(CFU/g)

CFU/g = Average no. of colonies X Dilution factor

2. การวิเคราะห์หา Coliform baceria (BAM, 2002)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Lauryl tryptose broth
2. Brilliant green lactose bile (BGLB) broth, 2%
3. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์(Phosphate buffer solution)

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 ชั่งตัวอย่างๆละ 10 กรัม ลงในขวดปลอดเชื้อ

1.2 เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 90 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วยความเร็วต่ำเป็นเวลา 1 นาทีนำไปตั้งทิ้งในตู้เย็น 30 นาที

1.3 ทำการเจือจางให้เป็น 1: 10, 1:100และ 1:1000 ตามลำดับโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

2. การตรวจนับจุลินทรีย์

2.1 การตรวจสอบขั้นแรก (Presumptive test)

2.1.1 เตรียมหลอดทดลองพร้อมหลอดดักก๊าซวางคว่ำในหลอดทดลอง แบบ 3 แถว และแบบ 5 แถว

2.1.2 ดูดตัวอย่างอาหารในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแถว 1, 2, 3 (4, 5) ตามลำดับ โดยดูดตัวอย่างอาหารในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ LST broth ที่มีหลอดดักก๊าซวางคว่ำในหลอดทดลอง

2.1.3 เขย่าหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ตัวอย่างด้วย vortex จากนั้นนำไปเข้าตู้บ่มเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิ 35 ± 0.5 °ซ เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

2.1.4 อ่านผล ตรวจดูความขุ่นและก๊าซในหลอดดักก๊าซที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอด หลอดที่มีก๊าซ ผลเป็นบวก แล้วทำการตรวจสอบในขั้นยืนยัน

2.2 การตรวจสอบขั้นยืนยัน(Confirmed test)

2.2.1 นำหลอดทดลองที่ให้ผลบวกในการตรวจสอบขั้นแรกทุกหลอดมาทำการยืนยันต่อไป ขั้นต่อไป

2.2.2 เตรียมหลอดทดลองพร้อมหลอดดักก๊าซวางคว่ำในหลอดทดลองเพื่อบรรจุอาหารเหลว BGLB 2% ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่หม้อนึ่งไอน้ำ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2.2.3 นำหลอดที่เกิดก๊าซจากการตรวจสอบขั้นแรก เขย่าเบาๆ แล้วใช้ Wire loop ซึ่งลนไฟจนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น ถ่ายจากหลอด LST ที่ให้ผลบวก ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอด BGLB 2% หลอดต่อหลอด

2.2.4 เขย่าหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ตัวอย่างด้วย vortex จากนั้นนำไปเข้าตู้บ่มเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิ 35 ± 0.5 °ซเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

2.2.5 อ่านผล ตรวจดูความขุ่นและก๊าซในหลอดดักก๊าซที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอด หลอดที่มีก๊าซ ผลเป็นบวก บันทึกผลคำนวณค่าโคลิฟอร์มแบคทีเรียโดย เปิดตาราง Most Probable Number Index(MPN)

3. การวิเคราะห์หา *E. coli* (BAM, 2002)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. EC broth
2. Levine EMB agar
3. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์(Phosphate buffer solution)

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 ชั่งตัวอย่างๆละ 10 กรัม ลงในขวดปลอดเชื้อ

1.2 เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 90 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วยความเร็วต่ำเป็นเวลา 1 นาทีนำไปตั้งทิ้งในตู้เย็น 30 นาที

1.3 ทำการเจือจางให้เป็น 1: 100, 1:000และ 1:0000 ตามลำดับโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

2. การตรวจนับจุลินทรีย์

2.1 การตรวจสอบขั้นแรก (Presumptive test)

2.1.1 เตรียมหลอดทดลองพร้อมหลอดดักก๊าซวางคว่ำในหลอดทดลอง แบบ 3 แถว และแบบ 5 แถว

2.1.2 ดูดตัวอย่างอาหารในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแถว 1, 2, 3 (4, 5) ตามลำดับ โดยดูดตัวอย่างอาหารในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ LST broth ที่มีหลอดดักก๊าซวางคว่ำในหลอดทดลอง

2.1.3 เขย่าหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ตัวอย่างด้วย vortex จากนั้นนำไปเข้าตู้บ่มเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิ 35 ± 0.5 °ซ เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

2.1.4 อ่านผล ตรวจดูความขุ่นและก๊าซในหลอดดักก๊าซที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอด หลอดที่มีก๊าซ ผลเป็นบวก แล้วทำการตรวจสอบในขั้นยืนยัน

2.2 การตรวจสอบขั้นยืนยัน(Confirmed test)

2.2.1 นำหลอดทดลองที่ให้ผลบวกในการตรวจสอบขั้นแรกทุกหลอดมาทำการยืนยันต่อไป ขั้นต่อไป

2.2.2 เตรียมหลอดทดลองพร้อมหลอดดักก๊าซวางคว่ำในหลอดทดลองเพื่อบรรจุอาหารเหลว EC broth ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่หม้อนึ่งไอน้ำ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2.2.3 นำหลอดที่เกิดก๊าซจากการตรวจสอบขั้นแรก เขย่าเบาๆ แล้วใช้ Wire loop ซึ่งลนไฟจนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น ถ่ายจากหลอด LST ที่ให้ผลบวก ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอด EC broth หลอดต่อหลอด

2.2.4 เขย่าหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ตัวอย่างด้วย vortex จากนั้นนำไปเข้าตู้บ่มเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิ 44.5 ± 0.5 °ซ เป็นเวลา 48 ± 2ชั่วโมง

2.2.5 หลอดที่ให้ผลเป็นบวก เขี่ยเชื้อบน Levine EMB agar เข้าตู้บ่มเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิ 35 ± 0.5 °ซ เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

2.2.5 ถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่สงสัย ซึ่งมีจุดดำตรงกลาง มีหรือไม่มี Metallic sheen นำไปทดสอบ IMViC test นำผลที่ได้มาเปิดตาราง Most Probable Number Index(MPN)

4. การวิเคราะห์หา *S. aureus* (BAM, 2002)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Baird-Parker medium (BP)
2. Brain heart infusion (BHI) broth
3. Coagulate plasma
4. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 ชั่งตัวอย่างๆละ 10 กรัม ลงในขวดปลอดเชื้อ

1.2 เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 90 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วยความเร็วต่ำเป็นเวลา 1 นาทีนำไปตั้งทิ้งในตู้เย็น 30 นาที

1.3 ทำการเจือจางให้เป็น 1: 10, 1:100และ 1:1000 ตามลำดับโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

2. การตรวจนับ *S. aureus*

2.1 ดูดตัวอย่างจากข้อ 1.3 จากระดับความเจือจางที่เหมาะสม จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงบน BP agar จำนวน 2 ซ้ำ

2.2 ใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อที่เกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วจาน

2.3 อบเพาะเชื้อที่ 35 ± 0.5 °ซเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.4 ตรวจสอบลักษณะโคโลนี เมื่อครบ 30 ชั่วโมง เลือกนับโคโลนีที่มีสีดำขอบขาวและแววใสรอบโคโลนีมีบริเวณใส (Clear zone) เลือกจากจานที่ชื้อเจริญ 20-200 โคโลนี

2.5 ทำเครื่องหมายตำแหน่งของโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าว แล้วนำจานอาหารไปบ่มต่ออีก 18 ชั่วโมง ให้นับโคโลนีที่มีสีดำแววหรือไม่มีขอบขาวและไม่มีบริเวณใสด้วย

2.6 ถ่ายโคโลนีที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ลงใน BHI แล้วอบเพาะเชื้อที่ 35 ± 0.5 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.7 ดูดตัวอย่างจาก 2.6 จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบแล้วเติม Coagulate plasma จำนวน 0.3 มิลลิลิตร ตรวจผลอีกครั้งเมื่อครบเวลา 2 ชั่วโมง

2.8 อบเพาะเชื้อที่ 35 ± 0.5 °ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตรวจผลการแข็งตัวของ plasma ถ้า plasmaยังไม่แข็งตัว ให้เก็บหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้องแล้วตรวจผลอีกครั้ง เมื่อครบ 2 ชั่วโมง

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

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Mannitol-egg yolk-polymyxin (MYP) agar
2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 ชั่งตัวอย่างๆละ 10 กรัม ลงในขวดปลอดเชื้อ

1.2 เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 90 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วยความเร็วต่ำเป็นเวลา 1 นาทีนำไปตั้งทิ้งในตู้เย็น 30 นาที

1.3 ทำการเจือจางให้เป็น 1: 10, 1:100และ 1:1000 ตามลำดับโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

2. การตรวจนับ *B. cereus*

2.1 เตรียม MYP agar เทลงเพลต จากนั้นดูดตัวอย่างปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร spread บนเพลต MYP agar

2.2 นำเพลตที่ผ่านการ spread เชื้อ เข้าตู้บ่มเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิ 30 ± 0.5 °ซ เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง สังเกตลักษณะรอบๆโคโลนีจะขุ่น โดยโคโลนีมีสีชมพู บันทึกผล พร้อมกับนำมาทดสอบขั้นต่อไป

2.3 เขี่ยเชื้อที่มีลักษณะที่สงสัยลงใน Nutrient agar slant เลี้ยงเชื้อโดยเข้าตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 30 ± 0.5 °ซ เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบโดยการย้อมสีแกรมเพื่อดูลักษณะ

2.4 เตรียมหลอดซึ่งบรรจุสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าตัวอย่างด้วย vortex ทดสอบ ขั้นยืนยันโดยวิธี Nitrate broth , Phenol red glucose และ Modified VP medium

6. การวิเคราะห์หา *Salmonellae* sp. (BAM, 2002)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Lactose broth
2. Rappaport-Vassiliadis (RV) medium
3. Selenite cystine (SC) broth
4. Tetrathionate (TT) broth
5. Hektoen enteric (HE) agar
6. Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar
7. Bismuth sulfite (BS) agar

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 ชั่งตัวอย่าง ๆ ละ 10 กรัม ลงในขวดปลอดเชื้อ

1.2 เติม Lactose broth จำนวน 90 มิลลิลิตร ปั่นด้วยความเร็วต่ำเป็นเวลา 1 นาที

1.3 อบเพาะเชื้อที่ 35 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. การตรวจนับ *Salmonellae* sp.

2.1 Selective enrichment

2.1.1 ผสมPre- enrichment culture ให้เข้ากัน แล้วดูดมาตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร เติมลงใน TBGB 10 มิลลิลิตร และ SCB 10 มิลลิลิตร

2.1.2 อบเพาะเชื้อในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 43 ± 0.5 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2. การเพาะเชื้อใน Select agar

2.2.1 นำตัวอย่างจาก Selective enrichment medium(2.2) มาเพาะลงบน BGA และ BSA plates

2.2.2 อบเพาะเชื้อที่ 35 ± 0.5 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2.3 ตรวจผลลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นดังนี้

อาหาร BGA : โคโลนีของ *Salmonellae* sp. คือ ไม่มีสี ใส หรือมีสีชมพูแดงในขณะที่อาหารมีสีชมพูหรือแดง

อาหาร BSA : โคโลนีของ *Salmonellae* sp. จะมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ บางครั้งอาจมีโคโลนีสะท้อนแสง อาหารรอบๆโคโลนีสีน้ำตาล

2.3 การจำแนกและการทดสอบทางชีวเคมี

2.3.1 เลือกเฉพาะโคโลนีที่คาดว่าเป็น *Salmonellae* sp.จากอาหาร BGAและ BSA ถ่ายลงใน TSI และ LIA agar โดยstreaking the slant และ stabbing the butt

2.3.2 อบเพาะเชื้อที่ 35 ± 0.5 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3.3 ลักษณะเฉพาะของ *Salmonellae* บนอาหารTSI จะพบสีแดงที่ slant (สภาพเป็นด่าง) และพบสีเหลืองที่ butt (สภาพเป็นกรด) อาจจะมีการสร้าง H_2S ด้วยหรือไม่ก็ได้สังเกตสีดำของ butt ลักษณะเฉพาะของ *Salmonellae* บนอาหาร LIA จะพบเชื้อสามารถเจริญได้ทั้งบริเวณผิวและตามรอยที่แทงลูบ อาหารจะมีสีม่วงทั่วหลอด ถ้ามี H_2S จะเห็นเป็นสีดำ

7. การวิเคราะห์หา *V. parahaemolyticus* (BAM, 2002)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Phosphate Buffer Saline (PBS)

2. Thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) agar

1.การเตรียมตัวอย่าง

1.1 ชั่งตัวอย่างๆละ 10 กรัม ลงในขวดปลอดเชื้อ

1.2 เติม Phosphate Buffer Saline จำนวน 90 มล. แล้วปั่นด้วยความเร็วต่ำเป็นเวลา 1 นาทีนำไปตั้งทิ้งในตู้เย็น 30 นาที

1.3 ทำการเจือจางให้เป็น 1: 10, 1:100และ 1:1000 ตามลำดับโดยใช้ 3% saline solution เป็นสารเจือจาง

2. การตรวจหา *V. parahaemolyticus*

2.1 ดูดตัวอย่างจากความเข้มข้นสูงสุด จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน 9 มิลลิลิตร Double strength GSTB จำนวน 3 หลอด และสำหรับความเข้มข้นรองลงมา ให้ดูดมาจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน 9 มิลลิลิตร Single strength GSTB อย่างละ 3 หลอด

2.2 อบเพาะเชื้อที่ 35 ± 0.5 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจและรายงานผล

2.3 ถ่ายตัวอย่างจาก GSTB จำนวน 1 loopful ลงบน TCBS pleats โดยเลือกหลอดที่มีความขุ่น จากนั้นนำไปอบเพาะเชื้อที่ 35 ± 0.5 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.5 ทำการตรวจโคโลนีที่มีสีน้ำเงินเขียวและมีสีดำตรงกลาง ซึ่งสามารถใช้ Sucrose ได้ แต่ถ้าได้โคโลนีสีเหลืองใช้ Sucrose ไม่ได้

2.6 ทำการแยกโคโลนีที่คาดว่าเป็น *V. parahaemolyticus* โดยการ streak ลงบนอาหารต่อไปนี้และอบเพาะเชื้อที่ 35 ± 0.5 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

TSI	K/Acid no gas no H_2S
Indole(SIM)	+
Motility(SIM)	+
L-lysine HCl	+

2.7 ถ่ายเชื้อจาก TSI ลงใน peptone water และอบเพาะเชื้อที่ 35 ± 0.5°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำารทดสอบทางชีวเคมี เพื่อยืนยันผล

8. การวิเคราะห์หา *C. perfringen* (BAM, 2002)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Peptone dilution
2. Tryptose-sulfite-cycloserine (TSC) agar
3. Chopped liver broth

1. วิธีการเตรียมตัวอย่าง

1. 1 ชั่งตัวอย่าง ๆ ละ 25 กรัม ลงในขวด Peptone dilution(1: 10) ตีป่นด้วย Stomacher

1.2 เตรียมต่อที่ความเจือจางต่างๆ 1:100และ 1:1000 ตามลำดับ โดยใช้ Peptone dilution แทนสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

2. การตรวจหา *C. perfringen*

2.1 เตรียม TSC agar ที่ปราศจากegg yolk จากนั้นดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรเพื่อทำการ pour pate กับ TSC agar ที่ปราศจากegg yolk และเตรียม TSC agar ที่มี egg yolk และดูดตัวอย่าง 0.1 ลงบนเพลต TSC agar ที่มี egg yolk นำไปวางใน anaerobic jar และบ่มเพาะเชื้อที่ 35 ± 0.5 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีจะมีสีดำ และรอบๆจะใส

2.2 เตรียม Chopped liver broth หลอดละ 2 มิลลิลิตรจากนั้นนำโคโลนีที่ต้องสงสัยเลี้ยงใน Chopped liver broth บ่มเพาะเชื้อที่ 35 ± 0.5 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นผลเป็นบวก

2.3 นำหลอดที่ต้องสงสัยมาทำการยืนยันผล โดยการย้อมแกรม , Lactose- gelatin media และทำ Motility-nitrate

ภาคผนวก ข

Most Probable Number from Serial Dilutions

ตารางภาคผนวกที่ 1 MPN สำหรับ 3 หลอดทดลอง ความเข้มข้น 0.1, 0.01, and 0.001MPN/ กรัม ที่ระดับนัยสำคัญ 95%

Pos. tubes			MPN/g	Pos. tubes			MPN/g
0.10	**0.01**	**0.001**		**0.10**	**0.01**	**0.001**	
0	0	0	<3.0	2	2	1	28
0	0	1	3.0	2	2	2	35
0	1	0	3.0	2	3	0	29
0	1	1	6.1	2	3	1	36
0	2	0	6.2	3	0	0	23
0	3	0	9.4	3	0	1	38
1	0	0	3.6	3	0	2	64
1	0	1	7.2	3	1	0	43
1	0	2	11	3	1	1	75
1	1	0	7.4	3	1	2	120
1	1	1	11	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	3	0	16	3	2	2	210
2	0	0	9.2	3	2	3	290
2	0	1	14	3	3	0	240
2	0	2	20	3	3	1	460
2	1	0	15	3	3	2	1100
2	1	1	20	3	3	3	>1100
2	1	0	15				
2	1	2	27				
2	2	0	21				

ตารางภาคผนวกที่ 2 MPN สำหรับ 5 หลอดทดลอง ความเข้มข้น 0.1, 0.01, 0.001MPN/ กรัม ที่ระดับนัยสำคัญ 95%

Pos. tubes			MPN/g	Pos. tubes			MPN/g
0.10	**0.01**	**0.001**		**0.10**	**0.01**	**0.001**	
0	0	0	<1.8	2	2	1	12
0	0	1	1.8	2	2	2	14
0	1	0	1.8	2	3	0	12
0	1	1	3.6	2	3	1	14
0	2	0	3.7	2	4	0	15
0	2	1	5.5	3	0	0	7.8
0	3	0	5.6	3	0	1	11
1	0	0	2	3	0	2	13
1	0	1	4	3	1	0	11
1	0	2	6	3	1	1	14
1	1	0	4	3	1	2	17
1	1	1	6.1	3	2	0	14
1	1	2	8.1	3	2	1	17
1	2	0	6.1	3	2	2	20
1	2	1	8.2	3	3	0	17
1	3	0	8.3	3	3	1	21
1	3	1	10	3	3	2	24
1	4	0	11	3	4	0	21
2	0	0	4.5	3	4	1	24
2	0	1	6.8	3	3	2	24
2	0	2	9.1	3	4	0	21
2	1	0	6.8	3	5	0	25
2	1	1	9.2	4	0	0	13
2	1	2	12	4	0	1	17
2	2	0	9.3	4	0	2	21

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

Pos. tubes			MPN/g	Pos. tubes			MPN/g
0.10	**0.01**	**0.001**		**0.10**	**0.01**	**0.001**	
4	0	3	25	5	2	0	49
4	1	0	17	5	2	1	74
4	1	1	21	5	2	2	94
4	1	2	26	5	2	3	120
4	1	3	31	5	2	4	150
4	2	0	22	5	3	0	79
4	2	1	26	5	3	1	110
4	2	2	32	5	3	2	140
4	2	3	38	5	3	3	180
4	3	0	27	5	3	4	210
4	3	1	33	5	4	0	130
4	3	2	39	5	4	1	170
4	4	0	34	5	4	2	220
4	4	1	40	5	4	3	280
4	4	2	47	5	4	4	350
4	5	0	41	5	4	5	430
4	5	1	48	5	5	0	240
5	0	0	23	5	5	1	350
5	0	1	31	5	5	2	540
5	0	2	43	5	5	3	920
5	0	3	58	5	5	4	1600
5	1	0	33	5	5	5	>1600
5	1	1	46				
5	1	2	63				
5	1	3	84				

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ 3 คุณภาพทางกายภาพและเคมีของบูดูดิบ ก่อนและหลังการประยุกต์ใช้ระบบ HACCP

Treatment	ครั้งที่							
	1	2	3	4	5	6	$\overline{X}$	SD
a_w								
ก่อน	0.70	0.74	0.71	0.79	0.77	0.79	0.75	0.04
หลัง	0.72	0.68	0.68	0.68	0.69	0.63	0.68	0.29
pH								
ก่อน	5.36	5.64	5.50	5.86	5.95	5.71	5.67	0.22
หลัง	5.74	5.86	5.99	5.77	5.90	6.00	5.88	0.11
Acidity								
ก่อน	2.54	2.10	2.22	2.52	2.41	2.27	2.34	0.18
หลัง	2.44	2.16	2.36	2.10	2.39	2.15	2.27	0.15
Salt								
ก่อน	22.35	22.65	22.45	23.05	23.12	22.74	22.73	0.31
หลัง	22.56	21.68	21.94	22.06	22.69	21.11	22.01	0.58
Histamine								
ก่อน	411.85	397.43	426.75	403.25	441.9	409.2	415.06	16.44
หลัง	388	385.6	389.5	399.2	396.5	411.5	395.05	9.59

ตารางภาคผนวกที่ 4 คุณภาพทางกายภาพและเคมีของน้ำบูดูข้าวยำสำเร็จรูป ก่อนและหลังการประยุกต์ใช้ระบบ HACCP

Treatment	ครั้งที่							
	1	2	3	4	5	6	$\overline{X}$	SD
a_w								
ก่อน	0.68	0.72	0.71	0.73	0.74	0.68	0.71	0.03
หลัง	0.71	0.65	0.68	0.72	0.71	0.67	0.69	0.03
pH								
ก่อน	5.35	5.21	5.4	5.12	5.22	5.16	5.24	0.11
หลัง	5.24	5.12	5.06	5.26	5.1	5.1	5.15	0.08
Acidity								
ก่อน	3.53	4.01	3.89	3.63	3.82	4.00	3.81	0.20
หลัง	3.6	3.5	3.55	3.55	3.7	3.48	3.56	0.08
Salt								
ก่อน	6.88	7.3	7	7.24	7.22	7.06	7.12	0.16
หลัง	7.3	6.96	7.26	7.04	7.23	7.09	7.15	0.14
Histamine								
ก่อน	88.5	99.5	97.63	95.93	99.25	98.89	96.62	4.19
หลัง	87.8	83.14	87	84.98	90	83.1	86.00	2.75

ตารางภาคผนวกที่ 5 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดของภาชนะอุปกรณ์และมือผู้ผลิต ก่อนและหลังการประยุกต์ใช้ระบบ HACCP ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Treatment		ครั้งที่ 1	2	3	4	5	6	$\bar{X}$	SD
กระทะ	ก่อน	300	372	275	345	366	292	325	41.24
	หลัง	290	216	220	228	234	256	240	27.96
หม้อ	ก่อน	356	320	326	304	300	366	329	27.03
	หลัง	285	235	222	204	242	260	241	28.51
จวัก	ก่อน	275	245	250	226	240	202	240	24.45
	หลัง	190	156	145	163	156	118	155	23.49
กระชอน	ก่อน	275	303	278	280	246	200	279	18.99
	หลัง	200	178	180	180	133	205	179	25.44
ถังขัน	ก่อน	385	373	375	333	320	296	347	35.86
	หลัง	220	156	185	167	169	147	174	25.94
เขียง	ก่อน	1005	969	1155	975	695	813	935	160.34
	หลัง	701	701	750	782	510	488	655	125.14
มีด	ก่อน	376	410	400	344	355	383	378	25.39
	หลัง	180	150	145	159	144	154	155	13.32
เครื่องปั่น	ก่อน	180	210	220	158	180	174	187	23.35
	หลัง	149	129	155	113	105	137	131	19.69
เหยือก	ก่อน	131	105	110	90	90	84	102	17.47
	หลัง	92	80	83	73	82	64	79	9.55
ขวด	ก่อน	10	6	6	6	4	4	6	2.19
	หลัง	0	0	0	0	0	0	0	0.00
มือ:ผลิต	ก่อน	175	125	155	129	150	122	143	20.87
	หลัง	100	104	89	107	98	92	98	6.89
มือ:บรรจุ	ก่อน	51	33	44	32	40	30	38	8.17
	หลัง	40	30	35	29	30	30	32	4.32

ตารางภาคผนวกที่ 6 จุลินทรีย์ดัชนีคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ ก่อนและหลังการประยุกต์ใช้ระบบ HACCP

Treatment		ครั้งที่						
		1	2	3	4	5	6	$\overline{X}$
บูดูดิบ								
Coliform bacteria (MPN/g)	ก่อน	2	2	2	2	2	2	2
	หลัง	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
E.coli (MPN/g)	ก่อน	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
	หลัง	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
ข่าทุบ *E.coli* (MPN/g)	ก่อน	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100
	หลัง	210	210	210	210	210	210	210
ตะไคร้ *E.coli* (MPN/g)	ก่อน	>1100	>1100	1100	>1100	>1100	>1100	>1100
	หลัง	240	240	240	240	210	210	210
หอมแดง *E.coli* (MPN/g)	ก่อน	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	หลัง	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
น้ำตาลทราย *E.coli* (MPN/g)	ก่อน	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	หลัง	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
น้ำตาลปี๊บ *E.coli* (MPN/g)	ก่อน	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	หลัง	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
น้ำมะขามเปียก *E.coli* (MPN/g)	ก่อน	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	หลัง	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
น้ำประปา *E.coli* (MPN/g)	ก่อน	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	หลัง	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
บูดูข้าวยำสำเร็จรูป								
Coliform bacteria (MPN/g)	ก่อน	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
	หลัง	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
E.coli (MPN/g)	ก่อน	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
	หลัง	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8

ตารางภาคผนวกที่ 7 จุลินทรีย์ก่อโรคของบูดูดิบและผลิตภัณฑ์ ก่อนและหลังการประยุกต์ใช้ระบบ HACCP

Treatment		ครั้งที่ 1	2	3	4	5	6	$\bar{X}$	SD
บูดูดิบ									
Total bacteria	ก่อน	590	672	688	610	660	562	630	50.30
(CFU/ g)	หลัง	285	337	299	349	315	285	311	26.4
B.cereus	ก่อน	51	45	54	48	48	48	49	3.1
(CFU/ g)	หลัง	5	5	9	3	7	3	5	2.34
C.perfringens	ก่อน	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	
(CFU/0.01 g)	หลัง	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	
บูดูข้าวยำสำเร็จรูป									
Total bacteria	ก่อน	201	145	184	154	176	136	166	25.04
(CFU/ g)	หลัง	62	50	53	55	55	43	53	6.29
B.cereus	ก่อน	9	7	6	4	3	7	6	2.19
(CFU/ g)	หลัง	0	0	0	0	0	0	0	0.00
S. aureus	ก่อน	63	53	59	49	46	54	54	6.26
(CFU/ g)	หลัง	15	15	19	7	8	14	13	4.60
Salmonellae sp.	ก่อน	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	
(CFU/ 25g)	หลัง	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	
C.perfringens	ก่อน	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	
(CFU/0.01 g)	หลัง	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	
V. parahaemolyticus									
(CFU/ 25g)	ก่อน	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	
	หลัง	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	

การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 8 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของค่า a_w, pH, Acidity, Salt และ Histamine ของบูดูดิบ ก่อนและหลังการประยุกต์ใช้ระบบ HACCP ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ปัจจัยคุณภาพ	SV	DF	SS	MS	F
a_w	Treatment	1	0.015	0.015	12.250 *
	Error	10	0.012	0.001	
	Total	11	0.027		
pH	Treatment	1	0.128	0.128	4.258 ns
	Error	10	0.301	0.030	
	Total	11	0.429		
Acidity	Treatment	1	0.018	0.018	0.676 ns
	Error	10	0.261	0.026	
	Total	11	0.278		
Salt	Treatment	1	1.555	1.555	7.151 *
	Error	10	2.175	0.217	
	Total	11	3.730		
Histamine	Treatment	1	1201.601	1201.601	6.632 *
	Error	10	1811.713	181.171	
	Total	11	3013.314		

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 9 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของค่า a_w, pH, Acidity, Salt และ Histamine ของน้ำบูดูข้าวยำสำเร็จรูป ก่อนและหลังการประยุกต์ใช้ระบบ HACCP ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ปัจจัยคุณภาพ	SV	DF	SS	MS	F
a_w	Treatment	1	0.001	0.001	1.714^{ns}
	Error	10	0.007	0.001	
	Total	11	0.008		
pH	Treatment	1	0.028	0.028	2.987^{ns}
	Error	10	0.009	0.009	
	Total	11	0.429		
Acidity	Treatment	1	0.188	0.188	8.346*
	Error	10	0.225	0.022	
	Total	11	0.412		
Salt	Treatment	1	0.003	0.003	0.120^{ns}
	Error	10	0.225	0.023	
	Total	11	0.228		
Histamine	Treatment	1	337.929	337.929	26.891*
	Error	10	125.665	12.5661	
	Total	11	463.593		

^{ns} ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 10 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดของภาชนะอุปกรณ์และมือผู้ผลิต ก่อนและหลังการประยุกต์ใช้ระบบ HACCP ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตัวอย่าง	SV	DF	SS	MS	F
กระทะ	Treatment	1	21336.333	21336.333	17.188*
	Error	10	12413.33	1241.333	
	Total	11	33749.667		
หม้อ	Treatment	1	2281.333	2281.333	29.652*
	Error	10	7716.667	771.667	
	Total	11	30598.000		
จวัก	Treatment	1	21675.000	21675.00	37.704*
	Error	10	5748.667	574.867	
	Total	11	27423.667		
กระชอน	Treatment	1	29601.333	29601.333	58.748*
	Error	10	5038.667	503.867	
	Total	11	34640.000		
ถังขัน	Treatment	1	89789.000	89789.00	91.676*
	Error	10	9794.00	979.400	
	Total	11	99581.000		
เขียง	Treatment	1	235200.000	235200.000	11.371 *
	Error	10	206838.67	20683.867	
	Total	11	442038.67		
มีด	Treatment	1	148741.33	148741.33	361.960*
	Error	10	4109.333	410.933	
	Total	11	152850.67		

^{ns} ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 10 (ต่อ)

ตัวอย่าง	SV	DF	SS	MS	F
เครื่องปั่น	Treatment	1	9296.333	9296.333	19.926*
	Error	10	4665.333	466.533	
	Total	11	13961.667		
เหยือก	Treatment	1	1541.333	1541.333	7.779*
	Error	10	1981.333	198.133	
	Total	11	3522.667		
ขวด	Treatment	1	108.000	108.000	45.00*
	Error	10	24.000	2.400	
	Total	11	132.000		
มือ:ก่อนผลิต	Treatment	1	5896.333	5896.333	24.419*
	Error	10	2414.667	241.467	
	Total	11	8311.000		
มือ:ก่อนบรรจุ	Treatment	1	108.000	108.000	2.531 ns
	Error	10	426.667	42.667	
	Total	11	534.667		

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 11 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยปริมาณจุลินทรีย์ของบูดูดิบและน้ำบูดูข้าวยำสำเร็จรูป ก่อนและหลังการประยุกต์ใช้ระบบ HACCP ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตัวอย่าง	SV	DF	SS	MS	F
บูดูดิบ					
จุลินทรีย์ทั้งหมด	Treatment	1	305602.083	305602.083	189.390*
	Error	10	16136.167	1613.617	
	Total	11	321738.25		
B. cereus	Treatment	1	5720.333	5720.333	759.339*
	Error	10	75.333	7.533	
	Total	11	5795.667		
น้ำบูดูข้าวยำสำเร็จรูป					
จุลินทรีย์ทั้งหมด	Treatment	1	38307.000	38307.000	114.967*
	Error	10	3332.000	333.200	
	Total	11	41639.000		
B. cereus	Treatment	1	108.000	108.000	45.000*
	Error	10	24.000	2.400	
	Total	11	132.000		
S. aureus	Treatment	1	5043.000	5043.000	166.987*
	Error	10	302.000	30.200	
	Total	11	5345.000		

^{ns} ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ภาคผนวก ค

ภาพภาคผนวกที่ 1 สถานที่ผลิตน้ำบูดูข้าวยำสำเร็จรูป ตำบลจะโหนง อำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา

ภาพภาคผนวกที่ 2 วัตถุดิบในการผลิตน้ำบูดูข้าวยำสำเร็จรูป ได้แก่ บูดูดิบ ตะไคร้ ข่า หอมแดง น้ำมะขามเปียก น้ำตาลปี๊บ น้ำตาลทราย (ตามลำดับ)

ภาพภาคผนวกที่ 3 ผลิตภัณฑ์น้ำบูดูข้าวยำสำเร็จรูป ของกลุ่มสตรีชุมชนอิสลามบ้านตรับ ตำบลจะโหนง อำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา

ก่อนการประยุกต์ใช้ระบบ ใช้มือเปล่าหยิบจับวัตถุดิบ

หลังการประยุกต์ใช้ระบบมีการสวมใส่ถุงพลาสติกที่สะอาดในการหยิบจับสัมผัสกับวัตถุดิบรวมทั้งการห่อหุ้มอุปกรณ์ที่ต้องสัมผัสกับวัตถุดิบด้วยถุงพลาสติกที่สะอาด

ภาพภาคผนวกที่ 4 ลักษณะการปฏิบัติงานก่อนและหลังการประยุกต์ใช้ระบบ HACCP

ก่อนการประยุกต์ใช้ระบบการแต่งกายปกติทั่วไป

หลังการประยุกต์ใช้ระบบมีการสวมใส่ถุงมือ และผ้ากันเปื้อน

ภาพภาคผนวกที่ 5 การแต่งกายก่อนและหลังการประยุกต์ใช้ระบบ HACCP

ก่อนการประยุกต์ใช้ระบบ ใช้ไม้ฟืน เป็นเชื้อเพลิงในการเคี่ยว

หลังการประยุกต์ใช้ระบบเปลี่ยนมา ใช้แก๊สเป็นเชื้อเพลิงในการเคี่ยว

ภาพภาคผนวกที่ 6 การใช้เชื้อเพลิงก่อนและหลังการประยุกต์ใช้ระบบ HACCP

ก่อนการประยุกต์ใช้ระบบ เก็บในหม้อที่ปิดฝาไม่สนิท

หลังการประยุกต์ใช้ระบบเปลี่ยนมา จัดเก็บในหม้อที่ปิดฝาสนิท

ภาพภาคผนวกที่ 7 การจัดเก็บน้ำบูดูข้าวยำสำเร็จรูป เพื่อรอบรรจุขวดก่อนและหลังการประยุกต์ใช้ระบบ HACCP