ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. De man Rogosa and Sharpe (MRS) ประกอบด้วย

Proteose peptone No.3	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Tween 80	1.0	มิลลิลิตร
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.1	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distillde water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั้น ปรับให้มี ph 6.5 ด้วย 6 N NaOH และ 6 N HCl นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

2.อาหารเหลว MRS (สูตรทดแทนด้วยน้ำนึ่งปลาทู) ประกอบด้วย

Sucrose	1.0	กรัม
Tween 80	1.0	มิลลิลิตร
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม
Distillde water	1,000	มิลลิลิตร
น้ำนึ่งปลาทูน่า	500	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น ปรับให้มีพีเอช 5.5 ด้วย 6 N NaOH และ 6 N HCl นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

วิธีเตรียมน้ำนึ่งปลาทูน่า

นำน้ำหนึ่งปลาทูน่ามากรองด้วยผ้าขาวบาง ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 1 คืน ตักไขมันที่ผิวหน้าทิ้ง นำมาปรับพีเอชเป็น 5.5 ตกตะกอนโปรตีนโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วกรองแยกตะกอนออก บรรจุขวด เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. Nutrient Agar (NA) ประกอบด้วย

Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น (ยกเว้น Agar) ปรับให้มีพีเอช 7.0 ด้วย 6 N NaOH และ 6 N HCl จึงใส่วุ้นลงไป หลอมละลายด้วยความร้อน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

4. Nutrient Agar Manganese Sulfate (NAMS) ประกอบด้วย

Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Manganese Sulfate	0.05	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น (ยกเว้น Agar) ปรับให้มีพีเอช 7.0 ด้วย 6 N NaOH และ 6 N HCl จึงใส่วุ้นลงไป หลอมละลายด้วยความร้อน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

5. Mannitol Eggyolk Kanamycin Agar (MYK) ประกอบด้วย

Peptone	10	กรัม
Beef Extract	1	กรัม
D – Mannitol	10	กรัม
Sodium Chloride	10	กรัม
Phenol Red	0.025	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	900	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น (ยกเว้น Agar) ปรับให้มีพีเอช 7.2 ด้วย 6 N NaOH และ 6 N HCl จึงใส่วุ้นลงไป หลอมละลายด้วยความร้อน นำไปฆ่าเชื้อ ด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติม Kanamycin ความเข้มข้นเท่ากับ 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/ml) และเติมไข่แดง 3% ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

6. Trypticase Soy Broth (TSB) ประกอบด้วย

Trypticase peptone	17	กรัม
Peptone	3	กรัม
K_2HPO_4	2.5	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น ปรับให้มีพีเอช 7.2 ด้วย 6 N NaOH และ 6 N HCl นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

7. Trypticase Soy Kanamycin Broth (TSK) ประกอบด้วย

Trypticase peptone	17	กรัม
Peptone	3	กรัม
K_2HPO_4	2.5	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น ปรับให้มีพีเอช 7.2 ด้วย 6 N NaOH และ 6 N HCl นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติม Kanamycin ความเข้มข้นเท่ากับ 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/ml) และเทใส่หลอดละ 10 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีและวิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์โปรตีน ตามวิธี (Lowry, 1996)

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลาย A : 1% (w/v) $CuSO_4 .5H_2O$ ในน้ำกลั่น
2. สารละลาย B : 1% (w/v) Sodium Potassium tartrate. $4H_2O$ ในน้ำกลั่น
3. สารละลาย C : 1% (w/v) $Na_2 CO_3$ ใน 0.1 M NaOH
4. สารละลาย D : ผสม A และ B ในอัตราส่วน 1 : 1 (v/v) ส่วน แล้วเติมสาร C 98 ส่วน
5. เจือจาง Folin – Ciocalteau reagent ด้วยน้ำในอัตราส่วน 1 : 1 (v/v)

วิธีการวิเคราะห์

1. ใช้สารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน 0.2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย D 2.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที
2. ใส่สารละลาย F 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้นาน 30 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นที่มีการเตรียมเหมือนตัวอย่าง เป็น blank
4. เตรียมกราฟโปรตีนมาตรฐานโดยใช้โบวินซีรัมอัลบูมิน (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน
5. นำข้อมูลมาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับปริมาณโปรตีน (BSA) ดังแสดงในภาพที่ 15

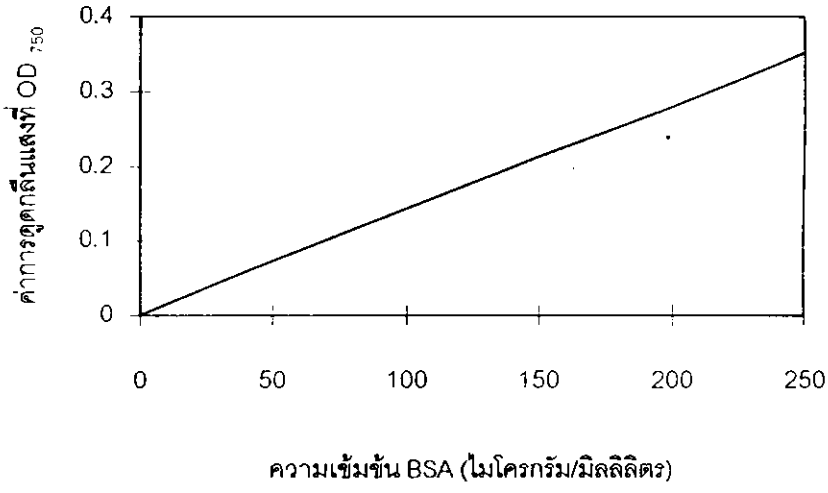
การเตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีน

1. ละลายโบวินซีรัมอัลบูมิน 01. กรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จะได้ stock solution ความเข้มข้น 1,000ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2. เจือจางสารละลายโบวินซีรัมลอัลบูมินให้ได้ความเข้มข้น 0 50 100 150 200 และ 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยนำ stock solution ปริมาตร 0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3. หาปริมาตรโปรตีนของแต่ละความเข้มข้นตามวิธีการข้างต้น

4. เขียนกราฟมาตรฐานโปรตีนของโบวินซีรัมอัลบูมิน ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร กับความเข้มข้น



ภาพที่ 16 กราฟมาตรฐานโปรตีน

2. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 mM พีเอช 6.5

สารเคมี

สารละลาย A : สารละลายโมโนโซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 50 mM ($NaH_2PO_4 2H_2O$ 6.899 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : สารละลายไดโซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 50 mM ($Na_2HPO_4 2H_2O$ 8.902 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

วิธีการ

โดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้พีเอช 6.5 โดยการวัดด้วยเครื่องวัดพีเอช

3. การเตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M พีเอช 4.5

สารเคมี

สารละลาย A : สารละลายกรดอะซิตอก ความเข้มข้น 0.1 M

(กรดอะซิติก 5.755 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : ละลาย $C_2H_3O_2Na$ 8.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร (ความเข้มข้น 0.1 M)

วิธีการ

โดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้พีเอช 4.5 โดยการวัดด้วยเครื่องวัดพีเอช

ภาคผนวก ค

เกณฑ์คุณภาพทางจุลินทรีย์เต้าเจี้ยว ของกระทรวงสาธารณสุข

1. จุลินทรีย์รวม/กรัม	น้อยกว่า 1×10^6
2. MPN Coliforms/กรัม	น้อยกว่า 500
3. MPN *E. coli*/กรัม	น้อยกว่า 3
4. *S. aureus*/กรัม	น้อยกว่า 100
5. *B. cereus*/กรัม	น้อยกว่า 100
6. *C. perfringens*/0.01 กรัม	ไม่พบ
7. *V. parahaemolyticus*/25 กรัม	ไม่พบ
8. *V. cholerae*/25 กรัม	ไม่พบ
9. *Salmonellae*/25 กรัม	ไม่พบ

ภาคผนวก ง

แบบสำรวจโรงงานเต้าเจี้ยว

1. ชื่อโรงงาน/กลุ่มเกษตรกร.....

   สถานที่ตั้ง .....

2. จำนวนคนงาน ..... คน

3. ปริมาณการผลิต.....ต่อเดือน

4. วัตถุดิบ

   4.1 ถั่วเหลือง แหล่งที่ซื้อ..... ปริมาณที่ซื้อต่อครั้ง.....

   ลักษณะการเก็บ .....

   4.2 แป้งสาลี แหล่งที่ซื้อ..... ปริมาณที่ซื้อต่อครั้ง.....

   ลักษณะการเก็บ .....

   4.3 เกลือ แหล่งที่ซื้อ..... ปริมาณที่ซื้อต่อครั้ง.....

   ลักษณะการเก็บ .....

5. กระบวนการผลิต

   5.1 ถั่วเหลือง วิธีล้าง .....

   วิธีแช่ .....

   วิธีต้ม : อัตราส่วน ถั่วเหลือง : น้ำ เท่ากับ ..... : .....

   : ปริมาณถั่วเหลือง..... ต่อการต้ม 1 ครั้ง

   : อุณหภูมิ.....เวลา .....

   : เวลาที่วางพักให้เย็น .....

   5.2 แป้งสาลี วิธีเตรียมแป้ง .....

   ปริมาณแป้ง .....ต่อการคั่ว 1 ครั้ง

   5.3 โคจิ เตรียมโคจิ โดยใช้อัตราส่วนของ ถั่วเหลือง : แป้งสาลี : หัวเชื้อ เท่ากับ

   .....:.....:..... บ่ม .....วัน สถานที่บ่ม .....

5.4 น้ำเกลือ ต้มน้ำเกลือ โดยใช้อัตราส่วนของเกลือ : น้ำ เท่ากับ .....: .....

วางพัก ..... กรองหรือไม่ .....

5.5 การหมักเต้าเจี้ยว ผสมโคจิกับน้ำเกลือ โดยใช้อัตราส่วนโคจิ : น้ำเกลือ เท่ากับ

..... : ..... หมักเป็นเวลา .....เดือน สถานที่หมัก .....

6. อุปกรณ์และภาชนะ

ภาชนะที่ใช้ในกระบวนการผลิต ได้แก่

6.1 กระด้งสำหรับเตรียมถั่วเหลือง วิธีทำความสะอาด

.....

6.2 กระด้งสำหรับเตรียมโคจิ วิธีทำความสะอาด

.....

6.3 โอ่งเคลือบ วิธีทำความสะอาด

.....

6.4 อุปกรณ์อื่น ๆ วิธีทำความสะอาด

.....

7. สถานที่ผลิต

7.1 ห้องเก็บวัตถุดิบ ..... มี .... ไม่มี

ลักษณะห้อง.....

.....

7.2 ห้องเตรียมโคจิ ..... มี .... ไม่มี

ลักษณะห้อง.....

.....

7.3 ห้องหมักเต้าเจี้ยว ..... มี .... ไม่มี

ลักษณะห้อง.....

.....

7.4 ห้องเก็บผลิตภัณฑ์ ..... มี .... ไม่มี

ลักษณะห้อง.....

.....

7.5 พื้นที่สำหรับเตรียมวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์

.....

.....

.....

8. สภาพแวดล้อม

8.1 มีสัตว์เลี้ยงเข้าในบริเวณผลิตหรือไม่ .....

8.2 บริเวณใกล้เคียงใช้เป็นบริเวณทิ้งขยะหรือไม่ .....

8.3 การกำจัดขยะ .....