บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 อุปกรณ์ สารเคมี ตัวอย่างเครื่องดื่ม และจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 เครื่องมือวิจัย

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) Spectro SC
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge) ALC รุ่น PK 121 R
3. เครื่องผสมสาร (vortex mixture)
4. ชุดเครื่องมือสำหรับพ่นโอโซน และพ่นอากาศ
    - เครื่องโอโซน OZZON รุ่น OZ-553 บริษัท แอคทีฟ ซายน์ จำกัด
    - เครื่องปั๊มลม SONIC Double type 12000
    - ตัวกรองอากาศ Gelman รุ่น ACRO-disc 50 ขนาด 0.2 ไมโครเมตร
    - หัวทราย
    - สายยางให้อากาศ
    - อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) Julabo SW 21
5. เครื่องชั่งไฟฟ้า Sartorius รุ่น BP 130S
6. ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator) Memmert
7. หม้อนึ่งอัดความดัน (autoclave) Hirayama
8. เครื่องวัดความเป็นกรด ด่าง Mettler Delta 345
9. เครื่องนับโคโลนี Suntex
10. จานเพาะเชื้อ (petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิลิตร
11. ปิเปตต์
12. หลอดทดลองขนาด 18 มิลลิเมตร X 150 มิลลิเมตร

3.1.2 สารเคมี และอาหารเพาะเชื้อ

1. Soyabean casein digest agar
2. 0.1% Peptone water
3. Potato dextrose agar
4. Double strength lauryl tryptose broth
5. Single strength lauryl tryptose broth
6. Brilliant green lactose bile broth
7. EC broth
8. Eosin methyl blue agar
9. MacConkey agar
10. Tetrathionate broth
11. Xylose-lysine deoxycholate agar
12. Potato dextrose agar ที่เติม Chloramphenicol ความเข้มข้นร้อยละ 0.05

<u>หมายเหตุ</u> อาหารเพาะเชื้อจากบริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Limited

3.1.3 แหล่งที่มาของตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องดื่ม น้ำตาลสด

น้ำตาลสด บริษัทโคฟี่

น้ำตาลสดร้านนฤมล จำกัด อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบุรี

น้ำตาลสดตราตลาดน้ำ

น้ำตาลสดบรรจุขวดไม่มียี่ห้อ ร้านบ้านน้ำตาล อำเภอเขาย้อย จังหวัดเพชรบุรี

น้ำตาลสดตักขายตลาดบางพลี อ.บางพลี จังหวัดสมุทรปราการ

น้ำลำไย

น้ำลำไย Fruit – D Brand บริษัทโคฟี่ จำกัด

น้ำลำไยตักขาย อ.บางพลี จังหวัดสมุทรปราการ

น้ำมะพร้าว

มะพร้าว ร้านแผงลอยริมถนนศรีนครินทร์ จังหวัดสมุทรปราการ

น้ำมะพร้าวตักขาย อ.บางพลี จังหวัดสมุทรปราการ

2. **จุลินทรีย์** สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองสั่งซื้อจากศูนย์จุลินทรีย์ MIRCEN สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ประกอบด้วย

Escherichia coli ATCC 25922

Salmonella Typhimurium ATCC 11331

Saccharomyces cerevisiae ATCC 4132

3.2 ระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมของการพ่นโอโซนในน้ำตัวอย่างเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

3.2.1 การสร้างการปนเปื้อนของ *Escherichia coli, Salmonella* Typhimurium และ *Saccharomyces cerevisiae* ในเครื่องดื่มพื้นบ้าน 3 ชนิดได้แก่น้ำตาลสด น้ำลำไยและน้ำมะพร้าว

เตรียมหัวเชื้อ (inoculum) แบคทีเรีย *Escherichia coli, Salmonella* Typhimurium โดยเพาะเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง Soyabean casein digest agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) หลังจากนั้นจึงชะเชื้อออกจากอาหารเพาะเชื้อแข็ง ด้วย 0.1% peptone water (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) นำหัวเชื้อมาวัดค่าความขุ่น (turbidity) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และเจือจางหัวเชื้อให้ได้ O.D. 0.9 จากนั้นนำหัวเชื้อที่เจือจางได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 8,500 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนเซลล์เพื่อใช้เติมลงในเครื่องดื่มพื้นบ้าน

ส่วนการเตรียมหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerivisiae* ทำโดยใช้เพาะเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง Potato dextrose agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) ชะเชื้อออกจากอาหารเพาะเชื้อแข็ง นำหัวเชื้อที่เจือจางลง 2 เท่า มาวัดค่าความขุ่น (turbidity) ของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และให้ได้ O.D. 1.2 แล้วนำหัวเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 4,500 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนเซลล์เพื่อใช้เติมลงในเครื่องดื่มพื้นบ้าน

เตรียมเครื่องดื่มพื้นบ้าน โดยนำเครื่องดื่มปริมาตร 1 ลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร มาทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดันอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติมเชื้อที่เตรียมไว้และทำการนับจำนวนเชื้อเริ่มต้นโดยวิธีนับบนจานเพาะเชื้อ (viable plate count) ด้วยอาหารเพาะเชื้อ Soyabean casein digest agar โดยใช้เทคนิค Pour plate (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) สำหรับแบคทีเรีย และใช้ Potato dextrose agar สำหรับยีสต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นับโคโลนีทั้งหมดที่เกิดขึ้นบนจานเพาะเชื้อ

3.2.2 ผลของอุณหภูมิในระหว่างการพ่นโอโซนต่อประสิทธิภาพในการลดปริมาณจุลินทรีย์ในเครื่องดื่ม

นำเครื่องดื่มพื้นบ้านที่สร้างการปนเปื้อนไว้แล้วด้วยการเติมจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและยีสต์) ตามวิธีในหัวข้อ 3.2.1 ทำการพ่นโอโซนความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อชั่วโมง โดยควบคุมอัตราการไหล 2.52 ลิตรต่อนาที (ภาพที่ 3-1) ทำการทดลองโดยควบคุมอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิสูง (50 องศาเซลเซียส) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่พ่นอากาศปราศจากเชื้อในอุณหภูมิ 3 ระดับเช่นเดียวกัน เก็บตัวอย่างทุก 30 นาที จนครบ 4 ชั่วโมง นำตัวอย่างน้ำมานับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือรอดในเครื่องดื่มโดยวิธีนับบนจานเพาะเชื้อ (viable plate count) โดยใช้เทคนิค Pour plate ด้วยอาหารเพาะเชื้อ Soyabean casein digest agar สำหรับแบคทีเรีย และใช้ Potato dextrose agar สำหรับยีสต์บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีทั้งหมดบนจานเพาะเชื้อ ทำการทดลองกับเครื่องดื่มทั้งสามชนิดเปรียบเทียบอุณหภูมิห้อง อุณหภูมิสูง และอุณหภูมิต่ำ คำนวณอัตราการตาย และเปอร์เซนต์รอดชีวิต

ภาพที่ 3-1 ชุดการทดลองระบบปราศจากเชื้อประกอบด้วย (1) ขวดแก้วขนาด 2 ลิตร ชุดทดลอง (2) ขวดแก้วขนาด 2 ลิตร ชุดควบคุม (3) เครื่องผลิตโอโซน (4) เครื่องพ่นอากาศ (5) ตัวกรองอากาศ และ (6) สายพ่นอากาศ

3.3 ผลของโอโซนต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในเครื่องดื่มที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

3.3.1 การตรวจวัดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด เชื้อกลุ่มโคลิฟอร์ม ฟีคัลโคลิฟอร์ม *Salmonella* ยีสต์ และรา ในตัวอย่างน้ำตาลสด น้ำลำไย และน้ำมะพร้าว ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำตาลสด น้ำลำไย และน้ำมะพร้าว จากร้านค้าในท้องตลาดแบบตักขาย นำตัวอย่างมาทำการตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยเทคนิค Pour plate โดยนับโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่ใช้อาหารเพาะเชื้อ Soyabean casein digest agar ทำการตรวจนับเชื้อในกลุ่มโคลิฟอร์ม และ ฟีคัลโคลิฟอร์ม โดยวิธี MPN (Most Probable Number Technique ภาคผนวก ข หมายเลข 2) โดยใช้อาหารเพาะเชื้อ Double Strength Lauryl tryptose broth (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) และ Single Strength Lauryl Tryptose broth (ภาคผนวก ก หมายเลข 5) ตรวจสอบผลจากความขุ่น และแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดดักแก๊ส (Durham tube) หาค่า MPN จากตาราง MPN index ทดสอบยืนยันแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มโดยนำเฉพาะหลอดที่ให้ผลบวกในขั้นต้นมาทดสอบต่อโดยปลูกถ่ายเชื้อเพื่อเลี้ยงต่อในอาหารเพาะเชื้อ Brilliant Green

Lactose Bile broth (ภาคผนวก ก หมายเลข 6)และยืนยันผลฟีคัลโคลิฟอร์ม ด้วยอาหารเพาะเชื้อ EC medium (ภาคผนวก ก หมายเลข 7) ตรวจสอบผลจากความขุ่น และแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดดักแก๊ส (Durham tube) หาค่า MPN จากตาราง MPN index และทดสอบขั้นสุดท้ายโดยทำการขีดเชื้อลงบนอาหารเพาะเชื้อ Eosin Methyl Blue Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 8) ตรวจโคโลนีของเชื้อที่มีลักษณะผิวมีสีเขียวมันวาวคล้ายปีกแมลงทับ (Metallic sheen) ตรวจนับเชื้อในกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมดโดยวิธีนับบนจานเพาะเชื้อด้วยอาหารเพาะเชื้อ MacConkey agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 9) โดยใช้เทคนิค Pour plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่มีสีแดงบนจานเพาะเชื้อ

การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร ทำโดยการเพิ่มจำนวนเชื้อเบื้องต้นในอาหารเพาะเชื้อ Tetrathionate broth (ภาคผนวก ก หมายเลข 10) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นขีดเชื้อลงบนอาหารเพาะเชื้อ XLD agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 11) ตรวจเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีสีชมพูมีจุดสีดำตรงกลางบนจานเพาะเชื้อ

ตรวจนับจำนวนเชื้อยีสต์ และราทั้งหมดด้วยวิธีนับบนจานเพาะเชื้อโดยใช้เทคนิค Pour plate ด้วยอาหารเพาะเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ที่เติมยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (ภาคผนวก ก หมายเลข 12) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

3.3.2 ผลของการพ่นโอโซนที่อุณหภูมิสูง 50 องศาเซลเซียส ต่อการยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ในเครื่องดื่มพื้นบ้านที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

การทดลองนี้ได้สภาวะของการพ่นโอโซนที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลองในหัวข้อ 3.2.2 ซึ่งได้แก่การพ่นโอโซนความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อชั่วโมง ด้วยอัตราการไหล 2.52 ลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นำมาทดลองกับเครื่องดื่มพื้นบ้านทั้ง 3 ชนิด ในระหว่างการทดลองจะเก็บตัวอย่างทุก 5 นาที จนครบ 20 นาที นำตัวอย่างมานับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือในเครื่องดื่มโดยวิธีนับบนจานเพาะเชื้อ (viable plate count) โดยใช้เทคนิค Pour plate ด้วยอาหารเพาะเชื้อ Soyabean casein digest agar สำหรับแบคทีเรีย และใช้ Potato dextrose agar

สำหรับยีสต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีทั้งหมดบนจานเพาะเชื้อ

3.3.3 การทดสอบความแตกต่างตามลักษณะทางประสาทสัมผัสของเครื่องดื่มพื้นบ้านที่ผ่านการพ่นด้วยโอโซน

การทดสอบความแตกต่างตามลักษณะทางประสาทสัมผัสของเครื่องดื่มพื้นบ้านที่ผ่านการพ่นด้วยโอโซนเป็นเวลา 5-20 นาทีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีการพ่นอากาศปราศจากเชื้อ ทำการทดสอบความแตกต่างรวมทั้งหมด (overall difference tests) วิธีเปรียบเทียบตัวอย่างคู่กับตัวอย่างมาตรฐาน (ภาคผนวก ค หมายเลข 1) โดยทำการเสนอตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง 1 ตัวอย่างระบุว่าเป็นตัวอย่างมาตรฐาน (R) ได้แก่เครื่องดื่มพื้นบ้านที่ไม่ผ่านการพ่นโอโซน ตัวอย่างมาตรฐานนี้เป็นตัวอย่างเดียวกับ 1 ใน 2 ตัวอย่างที่มีรหัส ตัวอย่างที่มีรหัสคือตัวอย่างเครื่องดื่มที่ผ่านการพ่นโอโซนนาน 5-20 นาที ผู้ทดสอบต้องเลือกตัวอย่างที่เหมือนกับตัวอย่างมาตรฐาน โดยใช้ผู้ทดสอบ 60 คน

3.4 การพ่นโอโซนเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มพื้นบ้าน

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการใช้โอโซนเพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในขั้นตอนการผลิตน้ำลำไย โดยทำการเตรียมเครื่องดื่มน้ำลำไยในห้องปฏิบัติการ ทำโดยนำเนื้อลำไยแห้งน้ำหนัก 85 กรัม ทำการพ่นโอโซนความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อชั่วโมง โดยควบคุมอัตราการไหล 2.52 ลิตรต่อนาที นาน 10 นาที และจัดให้มีชุดควบคุมที่ไม่ได้พ่นโอโซน จากนั้นนับจำนวนเชื้อทั้งหมดจากตัวอย่างลำไยแห้งโดยนำเนื้อลำไย 10 กรัม ผสมกับ 0.1% peptone water 90 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องตีตัวอย่าง จากนั้นนำไปนับเชื้อด้วยวิธีนับบนจานเพาะเชื้อ (viable plate count) โดยใช้เทคนิค Pour plate ด้วยอาหารเพาะเชื้อ Soyabean casein digest agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบผลการทดลองกับชุดควบคุมที่ไม่ได้พ่นโอโซน จากนั้นนำเนื้อลำไยไปต้มกับน้ำปริมาตร 3,000 มิลลิลิตร และน้ำตาล 450 กรัม นาน 10 นาที เก็บตัวอย่างน้ำลำไยเพื่อตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์หลังจากการต้ม เพื่อนับจำนวนเชื้อทั้งหมดเปรียบเทียบระหว่างชุดที่พ่นโอโซนและชุดควบคุมทุก 3 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง จนครบ 76 ชั่วโมง โดยน้ำตัวอย่างหากไม่ได้ทำการวิเคราะห์เชื้อทันทีจะต้องเก็บรักษาน้ำลำไยไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมานับจำนวนเชื้อ น้ำลำไยทั้ง

ชุดที่ใช้ลำไยแห้งที่ผ่านการพ่นโอโซน และชุดควบคุมจะถูกนำมาทำการทดสอบความแตกต่างตามลักษณะทางประสาทสัมผัสด้วยการทดสอบความแตกต่างตามลักษณะทางประสาทสัมผัส (attribute difference test) วิธีการเปรียบเทียบตัวอย่างคู่ (paired comparison test) โดยการเสนอตัวอย่าง 2 ตัวอย่าง พร้อมกับให้ผู้ชิมเปรียบเทียบว่าตัวอย่างไหนมีรสชาติที่ชอบมากกว่ากัน (ภาคผนวก ค หมายเลข 2) โดยใช้ผู้ทดสอบ 30 คน

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學