บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น บริษัท Mettler toledo จำกัด

3.1.2 เครื่องวัดการนำไฟฟ้า (Conductivitymeter) รุ่น บริษัท Mettler toledo จำกัด

3.1.3 เครื่องไล่ฟองอากาศ (Ultrasonic bath) รุ่น S 60 H บริษัท Elma จำกัด

3.1.4 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง บริษัท Mettler toledo จำกัด

3.1.5 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง บริษัท Mettler toledo จำกัด

3.1.6 เครื่องปั๊ม (suction pump) รุ่น DOA-P504-BN บริษัท Gast จำกัด

3.1.7 เครื่องวัดบริกซ์ (Refractometer) รุ่น Atr sw plus บริษัท Schmidt+haensch จำกัด

3.1.8 เครื่องวัดโพลาไรเซชัน (Saccharimeter)

3.1.9 เครื่องสเปกโตรโฟโทมิเตอร์ รุ่น Genesys 10S UV-Vis บริษัท Thermo scientific จำกัด

3.1.10 ตู้อบ บริษัท Binder จำกัด

3.1.11 เตาให้ความร้อน รุ่น C-MAG HS 7 บริษัท IKA จำกัด

3.1.12 ไมโครปิเปต

3.1.13 ตู้เย็น รุ่น i250 บริษัท Accuplus

3.1.14 ตู้ดูดควัน (Fume hood)

3.1.15 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น FD100R บริษัท Zealway จำกัด

3.1.16 เครื่องแก้วพื้นฐานในห้องปฏิบัติการ

3.2 สารเคมี

3.2.1 ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ (Iso-propyl alcohol; $(CH_3)_2CHOH$) เกรด AR บริษัท Techno pharmchem จำกัด

3.2.2 เมทิลีนบลู (Methylene blue; $C_{16}H_{18}ClN_3S.xH_2O$) เกรด AR บริษัท Techno pharmchem จำกัด

3.2.3 ฟีนอฟทาลีน (Phenolphthalein; $C_{20}H_{14}O_4$) เกรด AR บริษัท Techno pharmchem จำกัด

3.2.4 คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper (II) sulphate; $CuSO_4.5H_2O$) เกรด AR บริษัท Techno pharmchem จำกัด

3.2.5 โซเดียมโพเทสเซียมทาร์เทรต (Sodium potassium tartrate; $KNaC_4H_4O_6$) เกรด AR บริษัท Techno pharmchem จำกัด

3.2.6 กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid; HCl) เกรด AR บริษัท Emsure จำกัด

3.2.7 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH) เกรด AR บริษัท Techno pharmchem จำกัด

3.2.8 กรดฟอสฟิวริก (Phosphoric acid; H_3PO_4) เกรด AR บริษัท Techno pharmchem จำกัด

3.2.9 Potato dextrose agar เกรด AR บริษัท Himedia จำกัด

3.2.10 Plate count agar (Standarg methods agar) เกรด AR บริษัท Himedia จำกัด

3.2.11 Microbiology เกรด AR บริษัท 3M จำกัด

3.2.12 Perfringens agar base (T.S.C./ S.F.P.Agar Base) เกรด AR บริษัท Himedia จำกัด

3.2.13 Salmonella enrichment base เกรด AR บริษัท 3M จำกัด

3.2.14 3M Petrifilm E. coli / Coliform เกรด AR บริษัท 3M จำกัด

3.2.15 3M Petrifilm staph express เกรด AR บริษัท 3M จำกัด

3.2.16 3M Petrifilm salmonella express เกรด AR บริษัท 3M จำกัด

3.2.17 Tryptone agar เกรด AR บริษัท Himedia จำกัด

3.2.18 Yeast glucose chloramphenicol agar เกรด AR บริษัท Himedia จำกัด

3.2.19 Bat medium เกรด AR บริษัท Himedia จำกัด

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำเชื่อมด้วยวิธีการฆ่าเชื้อ จากถังสแตนเลสขนาดใหญ่ที่ผลิตในวันเดียวกันใส่ขวดสแตนเลสขนาด 1000 มิลลิลิตร จำนวน 42 ขวด ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด เพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าโพล ค่าบริกซ์ ค่าพีเอช ค่าเถ้าเชิงการนำฟ้า ค่าสี ค่าตะกอน การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส และวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

3.3.2 การศึกษาน้ำตาลรีดิวซ์ของน้ำเชื่อม

3.3.2.1 ชั่งตัวอย่างน้ำเชื่อม 50.00 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ถ่ายตัวอย่างลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 200 มิลลิลิตร เติมสต็อก 20 มิลลิลิตร หยดฟีนอฟทาลีน 3 หยด เติม 6 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ จนสารละลายกลายเป็นสีชมพู ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน กรองตัวอย่างลงในบีกเกอร์ 50 มิลลิลิตร ด้วยกระดาษกรอง แล้วนำตัวอย่างใส่บิวเรต ขนาด 50 มิลลิลิตร

3.3.2.2 ปิเปตเฟลิ่งห์เอ และ เฟลิ่งห์บี อย่างละ 5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร พร้อมใส่แท่งแม่เหล็ก ตั้งบนเตาให้ความร้อน

3.3.2.3 ปล่อยตัวอย่างที่เตรียมไว้ประมาณ 30 มิลลิลิตร เมื่อสารเริ่มเดือดจับเวลา 2 นาที เมื่อครบ 2 นาทีให้หยดเมทาลีนบลู 2-3 หยด จะมีสีน้ำเงิน

3.3.2.4 ปล่อยตัวอย่างลงให้หยดช้าๆจนกว่าจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีแดง บันทึกค่าที่อ่านได้

3.3.3 การศึกษาค่าโพลของน้ำเชื่อม

3.3.3.1 ชั่งตัวอย่างน้ำเชื่อม 26.00 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร

3.3.3.2 ถ่ายตัวอย่างลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน

3.3.3.3 กรองตัวอย่างลงในบีกเกอร์ 50 มิลลิลิตร ด้วยกระดาษกรอง แล้วนำไปวัดค่าด้วยเครื่องวัดค่าโพล

3.3.4 การศึกษาค่าบริกซ์ของน้ำเชื่อม

นำตัวอย่างน้ำเชื่อมไปวัดค่าบริกซ์ด้วยเครื่องวัดบริกซ์ บันทึกค่าที่อ่านได้

3.3.5 การศึกษาค่าพีเอชของน้ำเชื่อม

นำตัวอย่างน้ำเชื่อมไปวัดค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช บันทึกค่าที่อ่านได้

3.3.6 การศึกษาค่าเถ้าเชิงการนำไฟฟ้าของน้ำเชื่อม

3.3.6.1 ชั่งตัวอย่างน้ำเชื่อม 62.60 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.3.6.2 ถ่ายตัวอย่างลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน

3.3.6.3 กรองตัวอย่างลงในบีกเกอร์ 250 มิลลิลิตร ด้วยกระดาษกรอง แล้วนำไปวัดด้วยเครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า และวัดค่าการการนำไฟฟ้าของน้ำกลั่นด้วย เพื่อใช้ในการคำนวณ บันทึกค่าที่อ่านได้

3.3.7 การศึกษาค่าสีและความขุ่นของน้ำเชื่อม

3.3.7.1 ชั่งตัวอย่างน้ำเชื่อม 150.00 กรัม ลงในบีกเกอร์ 250 มิลลิลิตร

3.3.7.2 นำตัวอย่างมากรองด้วยระบบสุญญากาศโดยใช้กระดาษกรองเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร วางบนชุดกรองแล้วใช้สายยางต่อชุดกรองเข้าปั๊ม จากนั้นเปิดเครื่องแล้วเทตัวอย่างลงไป เมื่อกรองเสร็จนำตัวอย่างที่ได้ไปไล่ฟองอากาศด้วยเครื่องไล่ฟองอากาศเป็นเวลา 3 นาที แล้วนำไปวัดค่าบริกซ์ ด้วยเครื่องวัดบริกซ์ บันทึกค่าที่อ่านได้

3.3.7.3 นำตัวอย่างส่วนที่เหลือไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโทมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร โดยใช้เซลล์ 10 เซนติเมตร บันทึกค่าที่อ่านได้

3.3.8 การศึกษาการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

3.3.8.1 การทดสอบลักษณะปรากฏของน้ำเชื่อม

นำตัวอย่างน้ำเชื่อมที่เก็บไว้ศึกษามาเปรียบเทียบกับน้ำเชื่อมที่เก็บไว้เป็นตัวอย่างมาตรฐาน โดยควบคุมสภาวะต่างๆให้เหมือนกัน

3.3.8.2 การทดสอบลักษณะปรากฏของน้ำตาล

เตรียมตัวอย่างน้ำเชื่อมจากน้ำตาลทรายให้ได้ค่าบริกซ์เท่ากับตัวอย่างที่นำมาศึกษา

3.3.8.3 การทดสอบกลิ่นไม่เติมกรดของน้ำเชื่อม

เตรียมตัวอย่างน้ำเชื่อมให้ได้ 50 บริกซ์

3.3.8.4 การทดสอบกลิ่นเติมกรดของน้ำเชื่อม

แบ่งตัวอย่างน้ำเชื่อมที่ได้จาก 3.3.8.3 เติมกรดฟอสฟิวริก ร้อยละ 10 ปรับพีเอชให้ได้ 1.5

3.3.8.5 การทดสอบกลิ่นไม่เติมกรดของน้ำตาล

เตรียมตัวอย่างน้ำเชื่อมจากน้ำตาลทรายให้ได้ 50 บริกซ์

3.3.8.6 การทดสอบกลิ่นเติมกรดของน้ำตาล

แบ่งตัวอย่างน้ำเชื่อมที่ได้จาก 3.3.8.5 เติมกรดฟอสฟิวริก ร้อยละ10 ปรับพีเอชให้ได้ 1.5

3.3.8.7 การทดสอบรสของน้ำเชื่อม

เตรียมตัวอย่างให้ได้ 10 บริกซ์

3.3.8.8 การทดสอบรสของน้ำตาล

เตรียมตัวอย่างน้ำเชื่อมจากน้ำตาลทรายให้ได้ 10 บริกซ์

3.3.9 การศึกษาการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

3.3.9.1 การทดสอบหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยวิธี Total Plate Count ตรวจหาจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยทำการเจือจางตัวอย่างน้ำเชื่อมให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม (10^{-1}) นำไปวิเคราะห์เชื้อโดยเทคนิค Pour Plate ในอาหาร Total Plate Count Agar (PCA) ดูดตัวอย่างลงในจานเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร เทอาหารเลี้ยงเชื้อ 15-20 mL ลงไปผสมกับตัวอย่าง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจนับปริมาณจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผลและคำนวณในหน่วย CFU/mL

3.3.9.2 ทดสอบหาเชื้อ *Bacillus cereus* โดยใช้เทคนิค Spread plate

ตรวจหาเชื้อ *Bacillus cereus* โดยทำการเจือจางตัวอย่างน้ำเชื่อมให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม (10^{-1}) นำไปวิเคราะห์โดยเทคนิค Spread plate ในอาหาร MYP โดยดูดตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อ ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมชุปแอลกอฮอล์เพื่อฆ่าเชื้อ แล้วลนไฟเพื่อกำจัดแอลกอฮอล์ออก ทิ้งให้เย็น แล้วเกลี่ยที่ผิวหน้าอาหารแข็งให้ตัวอย่างกระจายทั่วผิวหน้า ปล่อยให้ตัวอย่างซึมลงที่ผิวหน้าอาหารเพาะเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ35 °C เป็นเวลา เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร บันทึกผลและคำนวณในหน่วย CFU/mL

3.3.9.3 ทดสอบหาเชื้อ *Clostridium Perfringens* โดยใช้เทคนิค Pour plate

ตรวจสอบหาเชื้อ *Clostridium Perfringens* โดยทำการเจือจางตัวอย่างน้ำเชื่อมให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม (10^{-1}) นำไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Pour plate ในอาหาร Perfringens Agar Base เทอาหารประมาณ 10 มิลลิลิตร ของจานเพาะเลี้ยงทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว ปิเปตตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร ลงบนอาหารที่แข็งตัว เททับด้วยอาหาร Perfringens Agar Base ประมาณ 15 มิลลิลิตร ค่อยๆหมุนจานเพาะเลี้ยงให้อาหารผสมเข้ากันโดยการหมุนเบาๆ ตั้งทิ้งไว้อาหารแข็งตัวหงายเพลทแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 °C เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะโคโลนีสีดำ ขนาด 2-4 มิลลิเมตร มีโซนใสขาวรอบโคโลนี บันทึกผลและคำนวณในหน่วย CFU/mL

3.3.9.4 ทดสอบหาปริมาณเชื้อ Yeast และ Mold โดยใช้เทคนิค Pour plate

ตรวจสอบหาเชื้อ Yeast และ Mold โดยทำการเจือจางตัวอย่างน้ำเชื่อมให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม(10^{-1}) นำไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Pour plate ในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ดูดตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร เทอาหารเลี้ยงเชื้อ 15-20 มิลลิลิตร ลงไปผสมกับตัวอย่าง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3-5 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร บันทึกผลและคำนวณในหน่วย CFU/10g

3.3.9.5 ทดสอบหาปริมาณเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดย 3M Petrifilm Staph Express Count Plate

1) วางแผ่น 3M Petrifilm บนพื้นราบเปิดแผ่นบนพื้น ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงตรงกลางแผ่น 3M Petrifilm ค่อยๆปิดแผ่น 3M Petrifilm ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ วางตัวกด (Spreader) บนแผ่น 3M Petrifilm ใช้นิ้วชี้กดแรงพอประมาณ จนตัวอย่างกระจายเต็มวงกลมภายในขอบโฟม ปล่อยแผ่นฟิล์มอยู่กับที่ 1-2 นาที เพื่อเจลแข็งตัว

2) บ่มแผ่น 3M Petrifilm ในตู้บ่มโดยวางแผ่นให้ด้านใสอยู่ด้านบน ซ้อนกันไม่เกิน 20 แผ่น บ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส หรือ 37±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าหากไม่พบโคโลนีขึ้นบนแผ่นเพาะเชื้อภายหลัง 24 ชั่วโมงถือว่าการตรวจสอบนั้นเสร็จสมบูรณ์

3) นับโคโลนีที่มีสีม่วง-แดง เป็น *Staphylococcus aureus* ช่วงที่เหมาะสมในการนับจำนวนโคโลนีควรไม่เกิน 150 โคโลนี บันทึกผลและคำนวณในหน่วย CFU/0.1mL

3.3.9.6 ทดสอบหาปริมาณเชื้อ *E.coli* โดยใช้แผ่น 3M Petrifilm TM EC

1) วางแผ่น 3M Petrifilm บนพื้นราบเปิดแผ่นบนพื้น ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงตรงกลางแผ่น 3M Petrifilm ค่อยๆปิดแผ่น 3M Petrifilm ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ วางตัวกด (Spreader) บนแผ่น 3M Petrifilm ให้แผ่นวงกลมครอบบริเวณที่หยดตัวอย่าง ใช้นิ้วชี้กดแรงพอประมาณจนตัวอย่างกระจายเต็มวงกลมภายในขอบโฟม ปล่อยแผ่นฟิล์มอยู่กับที่ 1-2 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว

2) บ่มแผ่น 3M Petrifilm ในตู้บ่มโดยวางแผ่นให้ด้านใสอยู่ด้านบน ซ้อนกันไม่เกิน 20 แผ่น บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ช่วงที่เหมาะสมในการนับจำนวนโคโลนีควรไม่เกิน 15-150 โคโลนี บันทึกผลและคำนวณในหน่วย CFU/mL

3.3.9.7 ทดสอบหาปริมาณเชื้อ *Salmonella spp*. โดยใช้เทคนิค Streak plate

ตรวจสอบหาเชื้อ *Salmonella spp.* โดยทำการเจือจางตัวอย่างน้ำเชื่อมให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม (10^{-1}) นำไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Streak plate บนแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ 3M เทตัวอย่างน้ำเชื่อม 100 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Salmonella Enrichment Base 100 มิลลิลิตร ที่ผสม Supplemented 4 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 41.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน แล้วนำแผ่น 3M มาหยอดน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมา Streak บนแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ 3M โดยใช้ลูปปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 41.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลและคำนวณในหน่วย CFU/25mL