บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่อง OZONIZER รุ่น SO 5 AE บริษัท SKY ZONE ระบบการผลิตแบบ corona discharge ความสามารถในการผลิต ozone ของเครื่องสูงสุด 1500 มิลลิกรัม/ชั่วโมง
2. ชุดวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน Veratox
3. เครื่องอ่านค่า Microwell ที่ 650 นาโนเมตร
4. เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 3 ตำแหน่ง รุ่น XT 920 M บริษัท PRECISA
5. เครื่องวัดความเข้มข้นของโอโซนในอากาศ (ozone detector) รุ่น GV-100 บริษัท GASTEC ประเทศญี่ปุ่น
6. ตู้ดูดควัน
7. ตู้รมก๊าซโอโซนรูปแปดเหลี่ยม ทำจาก resin ขนาดกว้าง 6 เซนติเมตร ยาว 20 เซนติเมตร.
8. อุปกรณ์ทางด้านจุลชีววิทยา
    - autoclave รุ่น SS-325 บริษัท TOMY ประเทศญี่ปุ่น
    - microwave
    - Laminar air flow รุ่น Model ABS 1200 บริษัท ASTEC MICROFLOW
    - บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 150 และ 500 มิลลิลิตร บริษัท SCHOTT ประเทศเยอรมัน
    - เข็มเขี่ยเชื้อ และห่วงถ่ายเชื้อ
    - Petri dish บริษัท PYREX ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - ขวด DURAN ขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร บริษัท SCHOTT ประเทศเยอรมัน
    - aluminium foil
    - ตะเกียงแอลกอฮอล์
    - สำลี
    - กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ
    - แผ่นสไลด์พร้อมแผ่นปิดสไลด์
    - ผ้าขาวบาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- หลอดทดลอง
- ขวดรูปชมพู่ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร
- pipette 10 มิลลิลิตร
- auto pipette
- กระบอกตวง

สารเคมี

1. น้ำกลั่น
2. 70% ethyl alcohol
3. Tartaric Acid บริษัท Ajax Finechem
4. Czapek Dox Agar บริษัท Himedia
5. PDA (Potato Dextrose Agar) บริษัท Union Science
6. DG 18 (Dichloran 18% Glycerol-Agar) บริษัท Himedia
7. AFAP (*Aspergillus flavus* - *Aspergillus parasiticus*-Agar) บริษัท Himedia

พืชทดลอง

1. พริกขี้หนูแห้ง
2. พริกป่น

จากตลาดเมืองใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่

สถานที่ทดลอง

ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 วิธีการทดลอง

ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ จากพริกขี้หนูแห้งและพริกป่นที่ซื้อจากตลาดเมืองใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

นำพริกขี้หนูแห้งและพริกป่นที่ซื้อจากตลาดเมืองใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ มาตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ โดยนำพริกที่ซื้อ มาแช่ในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ นำสารละลายมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DG 18 (Dichloran 18% Glycerol-Agar) และอาหาร AFAP (*Aspergillus flavus* -

Aspergillus parasiticus-Agar) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและ 5 วัน ตามลำดับ หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง แบคทีเรียและเชื้อรา โดยเฉพาะเชื้อราที่สร้างอะฟลาทอกซิน ด้วยวิธี viable count method (Kogure *et al*., 1979) คำนวณหาปริมาณเชื้อปนเปื้อนที่พบในตัวอย่าง โดยน้ำหนักของพริกตัวอย่าง

3.2.1 ศึกษากรรมวิธีที่เหมาะสมในการให้โอโซนเพื่อลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในพริกขี้หนูแห้งและพริกป่น

นำตัวอย่างพริกขี้หนูแห้งและพริกป่นที่ผ่านการตรวจวัดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนข้างต้นมาใช้ในการทดลองนี้

1. นำตัวอย่างพริกจำนวน 300 กรัม มาใส่ในภาชนะบรรจุ (Chamber) ที่มีปริมาตร 1,870 ลูกบาศก์เซนติเมตร (ภาพ 9) แล้วรมด้วยโอโซนความเข้มข้น 120 ppm เป็นเวลาต่างๆ คือ เป็นเวลา 0, 20, 40 และ60 นาที โดยติดตั้ง ozone generator แบบ fluidized bed พร้อมกับเครื่องวัดปริมาณโอโซนในอากาศ glass tube ozone detector แล้วนำตัวอย่างที่ผ่านและไม่ผ่านการรมโอโซนไปไว้ที่อุณหภูมิห้อง (~25 องศาเซลเซียส) เพื่อรอการตรวจสอบต่อไป รายละเอียดแบบจำลองที่ใช้ในการศึกษาและการติดตั้งแบบจำลองที่ใช้ในการศึกษาแสดงดังภาพ 10

2. นำพริกขี้หนูแห้งและพริกป่นข้างต้นมาตรวจหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) ก่อนและหลังการให้โอโซน

โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) มี 4 treatment

กรรมวิธีที่ 1 รมด้วยโอโซนเป็นเวลา 0 นาที (ชุดควบคุม)

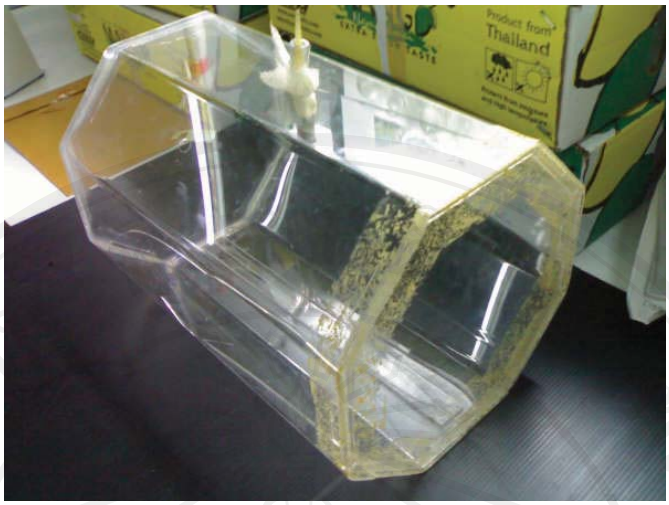
กรรมวิธีที่ 2 รมด้วยโอโซนเป็นเวลา 20 นาที

กรรมวิธีที่ 3 รมด้วยโอโซนเป็นเวลา 40 นาที

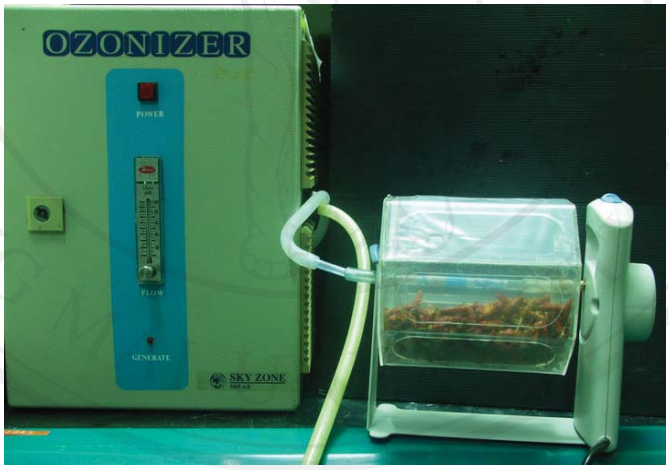
กรรมวิธีที่ 4 รมด้วยโอโซนเป็นเวลา 60 นาที

แต่ละ treatment มี 5 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 9 แบบจำลองที่ใช้ในการศึกษา (Chamber)

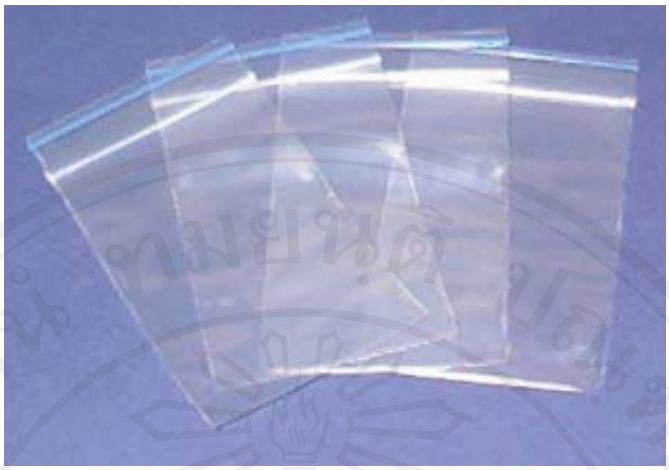


ภาพ 10 การติดตั้งแบบจำลองที่ใช้ในการศึกษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2 ศึกษาผลของโอโซนต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของพริกขี้หนูแห้งและพริกป่นระหว่างการเก็บรักษา

นำพริกขี้หนูแห้งและพริกป่นที่ผ่านการให้โอโซนตามกรรมวิธีที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 และชุดที่ไม่ได้รมโอโซน มาบรรจุลงในถุงพลาสติก (polypropylene bag) ปิดผนึกปากถุง ดังภาพ



ภาพ 11 ภาชนะบรรจุในการเก็บรักษา (polypropylene bag)

โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (~25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 เดือน สุ่มตัวอย่างพริกขี้หนูแห้งและพริกป่น มาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสี การสูญเสียน้ำหนัก ปริมาณความชื้น การยอมรับโดยรวม ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์ รา และสารอะฟลาทอกซินโดยวิธี ELISA (ดังแสดงในภาคผนวก) โดยตรวจวิเคราะห์ทุก 15 วัน ดังนี้

1) การวัดการสูญเสียน้ำหนักทำได้โดยวัดค่าน้ำหนักในวันเริ่มต้น และวันที่วัดผลโดยใช้เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 3 ตำแหน่ง แล้วนำค่าที่ได้มาหาค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักในวันที่วัดผล}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \times 100$$

2) ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นทั้งหมดในรูปของ colony forming unit (CFU/g) เป็นการนับปริมาณจุลินทรีย์ในจานเพาะเชื้อ ด้วยวิธี Pour plate (เชาวลิต, 2552) ดังนี้

- นำตัวอย่างมาเจือจางให้มีความเจือจางเป็น $1:10^5$
- ดูดตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตรใส่ในจานเพาะเชื้อ รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง
- นับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ
- รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่าง 1 กรัม โดยนำเอาค่าความเจือจางมาคูณกับค่าเฉลี่ยของจานที่นับได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/g) = จำนวนโคโลนีที่นับได้
Dilution ที่นับ

3) ปริมาณยีสต์และรา นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นทั้งหมดในรูปของ colony forming unit (CFU/g) โดยใช้วิธีวิเคราะห์จำนวนยีสต์ และรา ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (เชาวลิต, 2552) ดังนี้

- นำตัวอย่างมาเจือจางให้มีความเจือจางเป็น $1:10^3$
- เติมกรดทาร์ทาริก 1.1 มิลลิลิตร ใน PDA 100 มิลลิลิตร เพื่อให้อาหารเป็นกรดที่แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้
- ดูดตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อ
- รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง กลับจานเพาะเชื้อก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง
- นับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ
- รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่าง 1 กรัม โดยนำเอาค่าความเจือจางมาคูณกับค่าเฉลี่ยของจานที่นับได้
- หลักการเทเพลท คือการทำให้เชื้อกระจายในอาหารวุ้นที่หลอมเหลวแล้ว และเทลงในจานเพาะเชื้อ อาหารวุ้นที่ถูกหลอมเหลว ทิ้งไว้ให้อุ่นที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งจะผสมตัวอย่างเชื้อลงไป ทำให้กระจายอย่างสม่ำเสมอ โดยแกว่งจานเพาะเชื้อไปมาเบาๆ เพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อที่ผสมอยู่กระจายทั่วจานเพาะเชื้อ

ปริมาณยีสต์ และรา (CFU/g) = จำนวนโคโลนีที่นับได้
Dilution ที่นับ

4) ปริมาณสารอะฟลาทอกซิน โดยชุดวิเคราะห์อะฟลาทอกซินใช้หลักการของ ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

- นำตัวอย่างมาบดละเอียด 10 g ผสมกับ 70% Methanol 50 ml
- ทำการเขย่าแรงๆ 3 นาที หรืออาจปั่นโดยใช้เครื่องปั่นเป็นเวลา 2 นาที
- กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง หรือวัสดุที่ใช้แทนกันได้
- นำสารละลายที่ผ่านการกรองแล้ว ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน Veratox ของบริษัท THAI-NEO BIOTECH แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที
- จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่อง microwell reader ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ภายในเวลา 20 นาที อ่านค่าอะฟลาทอกซินที่ได้ในหน่วย ppb

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5) การเปลี่ยนแปลงของสี วัดสีด้วยเครื่องวัดสีของวัตถุ chroma meter ค่าที่ได้จะแสดงออกมาเป็น ค่าความสว่างของสี (L*) ค่าสีเขียว (a*) ค่าสีเหลือง (b*) ค่า chroma และค่า hue angle การวัดค่าต่างๆ เริ่มวัดจากวันที่เก็บ (วันที่ 0) จากนั้นตรวจวัดทุกๆ 15 วัน มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ค่าความสว่างของสี (the lightness value) (L*) เมื่อค่า L* มีค่าเข้าใกล้ 0 หมายถึง วัตถุมีสีคล้ำ ถ้าเข้าใกล้ 100 แสดงว่าวัตถุมีสีสว่าง

ค่าสีเขียว (a*) มีค่าอยู่ระหว่าง -60 ถึง +60 เมื่อมีค่าเป็นลบแสดงว่าวัตถุมีสีเขียว หากเป็นบวกแสดงว่าวัตถุมีสีแดง ถ้าค่า a ต่ำมากแสดงว่าวัตถุมีสีเขียวมาก

ค่าสีเหลือง (b*) มีค่าอยู่ระหว่าง -60 ถึง +60 เมื่อมีค่าเป็นลบแสดงว่าวัตถุมีสีน้ำเงิน หากเป็นบวกแสดงว่าเป็นสีเหลือง หากมีค่าสูงมากแสดงว่าวัตถุมีสีเหลืองมาก

6) ปริมาณความชื้น โดยการนำพืชตัวอย่างไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสนานประมาณ 3 วัน จนได้น้ำหนักแห้งที่คงที่ แล้วนำน้ำหนักแห้งที่ได้ไปเทียบหาเปอร์เซ็นความชื้น ตามสูตร

$$\% \text{ ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักทั้งหมด} - \text{น้ำหนักแห้ง}}{\text{น้ำหนักแห้ง}} \times 100$$

7) การยอมรับโดยรวม ทำการตรวจสอบคุณสมบัติทางประสาทสัมผัส โดยกำหนดระดับคะแนนดังนี้

คะแนน 5 = ยอมรับมากที่สุด

คะแนน 4 = ยอมรับมาก

คะแนน 3 = ยอมรับปานกลาง

คะแนน 2 = ยอมรับเล็กน้อย

คะแนน 1 = ไม่ยอมรับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved