บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และวิธีการ

3.1.1 วัตถุดิบและสารเคมี

วัตถุดิบ

- กาแฟผงชนิดปรุงสำเร็จ จากบริษัท เขาช่องอุตสาหกรรม (1979) จำกัด
- ถ้วยพลาสติกชนิดโพลีโพรพิลีน ขนาดบรรจุ 180 มิลลิลิตร
- ถ้วยพลาสติกชนิดโพลีสไตรีน ขนาดบรรจุ 220 มิลลิลิตร
- แผ่นฟิล์มพลาสติกลามิเนต (PEP 12/ PE25/ PE11D625 30)
- แผ่นฟิล์มเมทัลไลซ์

สารเคมี

- อาหารเลี้ยงเชื้อเพลทเคาท์ อะการ์ (plate count agar, PCA) ของ Merck, Dram Stadt, Germany
- อาหารเลี้ยงเชื้อ โพเตโตเดกซ์โตรส อะการ์ (potato dextrose agar, PDA) ของ Merck, Dram Stadt, Germany
- อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็น เอ (nutrient agar + $MgSO_4$ $7H_2O$ 0.005 กรัมต่อลิตร) ของ Merck, Dram Stadt, Germany

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์สำหรับการผลิตเครื่องดื่มกาแฟ

- หม้อสแตนเลส และอุปกรณ์เครื่องครัว
- เครื่องวัดอุณหภูมิเทอร์มอคัปเปิล (thermocouple) และเครื่องบันทึกข้อมูล (data logger)
- เตาแก๊ซไฟฟ้า กำลังไฟฟ้า 1,200 วัตต์
- อ่างน้ำเย็น (cooling bath)
- เครื่องปิดผนึก (sealer)
- เครื่องชั่งสาร 2 ตำแหน่ง (รุ่น BP 3100S, ยี่ห้อ Sartorius)

อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

- เครื่องวัดสี (color-view™ spectrophotometer , รุ่น 9000, ยี่ห้อ Gardner, USA)
- เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (hand refractometer, 0-30%, N1, ยี่ห้อ ATAGO)

อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter , รุ่น PHM 210, Meter Lab)
- อุปกรณ์เครื่องแก้ว

อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์

- ตู้บ่มเชื้อ
- ตู้ปลอดเชื้อ
- เครื่องอบความร้อนสูงด้วยไอน้ำในการฆ่าเชื้อ (autoclave)
- กล้องจุลทรรศน์
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- เครื่องเหวี่ยง (centrifuge)
- อุปกรณ์เครื่องแก้ว

อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส

- อุปกรณ์ทดสอบและแบบทดสอบ
- ตู้แช่เย็น

3.2 วิธีการทดลอง

1. การเตรียมกาแฟเย็นสำเร็จรูป (iced coffee mix powder)

เตรียมกาแฟผงสำเร็จรูป 1 กิโลกรัมต่อน้ำร้อน 1.5 ลิตร คนจนละลาย จากนั้นเติมน้ำเย็น 1.5 ลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

2. ตรวจเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำที่ใช้ในการผลิต จากตัวอย่าง 2 แกลลอน ในครั้งนี้ใช้น้ำบริโภคในการผลิตเครื่องดื่มกาแฟ

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

3. ตรวจเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์กาแฟจากโรงงานจำนวน 5 ชุดการผลิต เพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่จะใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา โดยใช้หลักเกณฑ์ต่างๆ ดังนี้

3.1 ควรเป็นเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่เป็นสาเหตุให้ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเกิดการเสื่อมเสีย

3.2 ควรเป็นเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่พบมากที่สุดในผลิตภัณฑ์นี้

3.3 ควรเป็นเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่สามารถทนความร้อนได้สูงสุดในผลิตภัณฑ์นี้ โดยนำสารละลายกาแฟมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ ดังนี้

- 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 10 15 20 25 และ 30 นาที ตามลำดับ
- 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 10 15 20 และ 25 นาที ตามลำดับ
- 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 6 9 12 และ 15 นาที ตามลำดับ

นับจำนวนและดูลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เกิดขึ้น เพื่อพิจารณาคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่จะใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาต่อไป

4. การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการศึกษา (ดัดแปลงจาก วิลาวัณย์, 2537)

4.1 การเตรียมสารละลายแขวนลอย (suspension)

- นำเชื้อจุลินทรีย์ที่จะใช้ทดสอบเขี่ยแยกเชื้อ (streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (nutrient agar กับ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005 กรัม) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
- แยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเขี่ยเชื้อลงในหลอดทดลอง เหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นสเตอริไลส์ 1 มิลลิลิตร ดูดส่วนน้ำออก
- เจือจางสารละลายแขวนลอยในน้ำกลั่นสเตอริไลส์ 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส
- นับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น ตามข้อ 4.2
- เจือจางสารละลายแขวนลอยในน้ำกลั่นสเตอริไลส์จนได้ความเข้มข้นของเซลล์ตามต้องการ คือ $10x10^6$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร (cfu/ml) เก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส
- ก่อนนำไปใช้ ควรเขย่าด้วยเครื่องกวนชนิดแม่เหล็ก เพื่อให้สารละลายแขวนลอยกระจายตัวดี ไม่เกาะกันเป็นกลุ่มก้อน

4.2 วิธีการนับจำนวนเชื้อเริ่มต้น

- นำตัวอย่างไปเจือจางในสารละลายเปปโตน ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} –10^{-6} โคโลนีต่อมิลลิลิตร
- นับจำนวนจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่โดยวิธีการเทเพลท (pour plate) ในอาหารเลี้ยง

เชื้อจุลินทรีย์ (plate count agar, PCA) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

- นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยจำนวนที่นับได้ คือจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น

5. การหาระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ณ อุณหภูมิที่กำหนด (thermal death time) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการฆ่าเชื้อในหลอดทดลอง (test tube method)

5.1 นำตัวอย่างกาแฟที่ผ่านการสเตอริไลส์แล้ว 9 มิลลิลิตร เติมสารละลายแขวนลอยที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1 โดยใช้ปิเปตดูดเชื้อใส่หลอดแก้วที่ปราศจากเชื้อหลอดละ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่องกวนชนิดแม่เหล็ก ใช้จำนวนทั้งหมด 21 หลอด ทำซ้ำ 2 ครั้ง นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่ต้องการศึกษา ดังนี้

- 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 15 30 45 และ 60 วินาที ตามลำดับ
- 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 10 20 30 และ 40 วินาที ตามลำดับ
- 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 10 20 30 และ 40 วินาที ตามลำดับ
- 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 5 10 15 และ 20 วินาที ตามลำดับ
- หลอดควบคุม 1 หลอดโดยเสียบเทอร์มอมิเตอร์ไว้ในหลอดนี้

5.2 แช่หลอดเชื้อในอ่างควบคุมอุณหภูมิตามอุณหภูมิที่กำหนดให้ระดับน้ำในอ่างน้ำร้อนอยู่เหนือระดับเชื้อในหลอด

5.3 เริ่มจับเวลาการให้ความร้อน เมื่ออุณหภูมิในหลอดควบคุมขึ้นถึงระดับที่ต้องการ

5.4 นำหลอดเชื้อออกจากอ่างน้ำร้อนตามระยะเวลาที่กำหนดในข้อ 5.1 สำหรับการให้ความร้อนในแต่ละอุณหภูมิ เมื่อนำออกจากอ่างน้ำร้อนแล้วแช่หลอดเชื้อในน้ำเย็น อุณหภูมิประมาณ 3-4 องศาเซลเซียสทันที

5.5 นับจำนวนจุลินทรีย์ที่ยังคงเหลืออยู่ในแต่ละหลอดโดยวิธีการเทเพลท ใช้ระดับความเจือจางต่างกันตามระยะเวลาที่ให้ความร้อน บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น คำนวณให้อยู่ในหน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร

5.6 เขียนกราฟการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ (survivor curve) จากความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับค่าลอการิทึม (log) ของจำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิต

5.7 หาค่า D ที่อุณหภูมิต่างๆ ตามที่กำหนดในข้อ 5.1 จากกราฟการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ โดยคำนวณค่า D จากส่วนกลับของความชันกราฟ

5.8 หาค่า Z จากกราฟแสดงระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ณ อุณหภูมิที่กำหนด (thermal death time curve, TDT curve) โดยเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของค่า D ที่ได้จากข้อ 5.7 กับอุณหภูมิที่ใช้ในการลดจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์

6. การหาอัตราการตายของเชื้อจุลินทรีย์ (lethal rate) ที่ 3 ระดับอุณหภูมิ คือ 65 70 และ 75 องศาเซลเซียส การศึกษาครั้งนี้ใช้เครื่องมือวัดอุณหภูมิเทอร์มอคัปเปิล และเครื่องบันทึกข้อมูลในการวัดอุณหภูมิและแปลผลข้อมูล

6.1 นำข้อมูลของค่า D และค่า Z ที่ได้มาคำนวณหาค่า F_T^z โดยใช้สมการ $F_T^z = D (\log N_0 - \log N)$ เพื่อใช้กำหนดเวลาในการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ

6.2 นำตัวอย่างกาแฟจำนวน 500 มิลลิลิตร บรรจุในหม้อสแตนเลส ให้ความร้อนโดยใช้เตาไฟฟ้าที่มีกำลังความร้อน 1,200 วัตต์ โดยใช้เทอร์มอคัปเปิล วัด ณ จุดที่ความร้อนเข้าถึงช้าที่สุด จนมีอุณหภูมิถึงระดับที่กำหนด และทำให้เย็นลงโดยใช้อ่างน้ำเย็นที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 3-5 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ระยะเวลาในการให้ความร้อนและทำให้เย็นลงจะต้องมีค่า F เท่ากับที่กำหนดไว้ในข้อ 6.1

6.3 พิจารณาเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อใช้ในกระบวนการผลิตกาแฟพร้อมดื่มต่อไป โดยพิจารณาจากระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตและผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยวิธีการทดสอบแบบสามเหลี่ยม (triangle test) ซึ่งเปรียบเทียบกับตัวอย่างกาแฟชงที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน

7. การเปรียบเทียบชนิดของบรรจุภัณฑ์ที่ใช้และศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์กาแฟพร้อมดื่มบรรจุถ้วยพลาสติก

7.1 นำตัวอย่างกาแฟพร้อมดื่มที่ผ่านการฆ่าเชื้อตามระดับอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม ปริมาตร 500 มิลลิลิตรบรรจุในถ้วยพลาสติกชนิดโพลีโพรพิลีน (PP) และถ้วยพลาสติกชนิดโพลีสไตรีน (PS) เปรียบเทียบการปิดฝาด้วยแผ่นฟิล์มปิดผนึกชนิดพลาสติกลามิเนต และแผ่นฟิล์มปิดผนึกชนิดเมทัลไลซ์ ด้วยเครื่องปิดผนึก ดังนั้นจะมีลักษณะการบรรจุ 4 แบบ ดังนี้

1. ถ้วยโพลีโพรพิลีน (PP) กับฟิล์มเมทัลไลซ์ (Ml)
2. ถ้วยโพลีโพรพิลีน (PP) กับฟิล์มพลาสติกลามิเนต (Pl)
3. ถ้วยโพลีสไตรีน (PS) กับฟิล์มเมทัลไลซ์ (Ml)
4. ถ้วยโพลีสไตรีน (PS) กับฟิล์มพลาสติกลามิเนต (Pl)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

7.2 เก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในตู้แช่เย็น ซึ่งควบคุมอุณหภูมิประมาณ 8 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการเก็บรักษา นาน 30 วันหรือจนกระทั่งผลิตภัณฑ์เกิดการเสื่อมเสีย

7.3 ตรวจสอบคุณภาพระหว่างการเก็บรักษา ดังนี้

- ตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์ และรา ทุก 3 วัน
- วัดค่าความเป็นกรดด่าง โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง ทุก 3 วัน
- วัดค่าสี โดยใช้เครื่องวัดสี ทุก 3 วัน
- วัดความหนาของชั้นครีม ทุก 3 วัน
- ตรวจสอบลักษณะทางประสาทสัมผัส โดยวิธีการทดสอบแบบสามเหลี่ยม ทุก 6 วัน เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษากับเครื่องดื่มกาแฟที่ผลิตใหม่ และแช่เย็นเก็บไว้ 1 วัน

7.4 จากข้อมูลที่ได้ นำมาใช้พิจารณาคัดเลือกชนิดของบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสม

8. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลทางสถิติใช้โปรแกรมเชิงเส้น (genernal linear model program, GLM) ออกแบบการทดลองเชิงตัวประกอบ (factorial experiment) เพื่อทดสอบผลการเปลี่ยนแปลงระหว่างอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ต่อคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์กาแฟพร้อมดื่มในแต่ละบรรจุภัณฑ์ โดยใช้ Least Significant Different (LSD) ในการประมาณค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละบรรจุภัณฑ์ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ทางสถิติสำเร็จรูป (SAS Version 8.1, 2000)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน