บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการศึกษา

วัตถุดิบ อุปกรณ์และสารเคมี

3.1 วัตถุดิบ

- น้ำผึ้งลำไย ที่เก็บในช่วงเดือน กุมภาพันธ์-เมษายน 2546 จากฟาร์มผึ้งสมเกียรติ อ.เมือง จ.เชียงใหม่
- น้ำผึ้งสาบเสือ เก็บในช่วงเดือน พฤศจิกายน 2546-มกราคม 2547 จากสุภาฟาร์มผึ้ง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่
- น้ำผึ้งขี้ไก่ย่านเก็บในช่วงเดือนพฤศจิกายน 2546-มกราคม 2547 จากสุภาฟาร์มผึ้ง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่
- Glucose (Fluka, Switzerland)
- Fructose (Fluka, Switzerland)
- Maltose (Fluka, Switzerland)
- น้ำตาลทรายขาวยี่ห้อมิตรผล

3.2 เชื้อจุลินทรีย์

- *Bacillus cereus* จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- *Enterobacter aerogenes* จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (Thailand Institute of Scientific and Technological Research, TISTR) โดยมีรหัสของเชื้อจุลินทรีย์ คือ TISTR 1468
- *Micrococcus luteus* จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (Thailand Institute of Scientific and Technological Research, TISTR) โดยมีรหัสของเชื้อจุลินทรีย์ คือ TISTR 884

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- *Pseudomonas fluorescens* จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (Thailand Institute of Scientific and Technological Research, TISTR) โดยมีรหัสของเชื้อจุลินทรีย์ คือ TISTR 358
- *Serratia marcescens* จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (Thailand Institute of Scientific and Technological Research, TISTR) โดยมีรหัสของเชื้อจุลินทรีย์ คือ TISTR 1354
- *Saccharomyces cerevisiae* จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (Thailand Institute of Scientific and Technological Research, TISTR) โดยมีรหัสของเชื้อจุลินทรีย์ คือ V116
- *Candida utilis* จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (Thailand Institute of Scientific and Technological Research, TISTR) โดยมีรหัสของเชื้อจุลินทรีย์ คือ TISTR 5001

3.3 เครื่องมือ และอุปกรณ์

3.3.1 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

- เครื่องวัดสี ColorQuest II (Hunter Laboratory Inc., USA)
- เครื่องวัดความข้นหนืด Brookfiled Rotary Viscometer (USA)
- Bright field microscope (Olympus CX31, Japan)
- Microscope Digital Camera System (Olympus DP12, Japan)

3.3.2 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

- Kjedahl digestion set (Tecator, USA)
- pH meter (Hanna Instrument, Italy)
- บิวเรตขนาด 25 และ 50 มิลลิลิตร (HGB, Germany)
- ปิเปตขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร (HGB, Germany)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert , USA)
- เตาเผาเถ้า (Oven, Gallenkamp, Muffle Furnace, England)
- เครื่องวัดค่าน้ำที่เป็นประโยชน์ (Novasina, Switzerland)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- เครื่องแยกของเหลวสมรรถนะสูง High Performance Liquid Cromatography
- ชุดตรวจไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ Quantofix Peroxide 25 (MN, Germany)

3.3.3 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา

- ปิเปตแบบ Measuring pipettes ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปตขนาด 100-1000 ไมโครลิตร และขนาด 20-100 ไมโครลิตร (Brand, Germany)
- จานเลี้ยงเชื้อ
- หม้อนึ่งความดัน (Gallenkamp, England)
- ตู้อบความร้อน (Hot air oven, Memmert : Model ULM – 400, USA)
- ขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 100 ,200 และ 500 มิลลิลิตร
- ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส (Haereous, England)
- ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส (Memmert, USA)
- ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส (Haereous, England)
- เครื่องนับจำนวนโคโลนี (Chiltern, England)
- เครื่องผสมแบบหมุนวน (Vortex genie 2 : Model G 560 E, USA)
- ตู้เย็น (Sharp, Thailand)
- กระดาษซับวงกลม (MN, Germany)

3.4 สารเคมี

- น้ำกลั่น
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Merck, Germany)
- กรดซัลฟูริก (Merck, Germany)
- คอปเปอร์ซัลเฟต (Carlo erba, Italy)
- กรดเกลือ (Merck, Germany)
- ฟีนอล์ฟทาลีน (Merck, Germany)
- เมธิลีนบลู (Fluka, Switzerland)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- Yeast extract
- Peptone
- โซเดียมโปตัสเซียมตาร์เตรต (Baker, U.S.A.)

3.5 โปรแกรมประมวลผลข้อมูล

- โปรแกรมประมวลผลข้อมูลสำเร็จรูป SPSS V.10.0

3.6 วิธีการศึกษา

ตอนที่ 1 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ของน้ำผึ้งลำไย น้ำผึ้งสาบเสือ และน้ำผึ้งขี้ไก่ย่าน

1.1 คุณภาพทางกายภาพ (physical qualities)

- วัดค่าสี โดยใช้เครื่องวัดสีในหน่วย Hunter (L* a* b*) (ภาคผนวก ข-7)
- วัดค่าความหนืด (Viscosity) โดยมีหน่วยเป็นเซนติพอยส์ (Centipoise) (ภาคผนวก ข-8)

1.2 คุณภาพทางเคมี (chemical qualities)

- วัดปริมาณของแข็งทั้งหมด (ภาคผนวก ข-2)
- วัดปริมาณน้ำทั้งหมด (ภาคผนวก ข-2)
- วัดปริมาณเถ้าทั้งหมด (ภาคผนวก ข-1)
- วัดปริมาณน้ำอิสระ โดยใช้เครื่องวัดค่าน้ำอิสระ (a_w)
- วัดปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ภาคผนวก ข-4)
- วัดปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรดได้ (ภาคผนวก ข-5)
- วัดค่าความเป็นกรดด่าง โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (Hanna Instrument, Italy) (ภาคผนวก ข-6)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- วัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส โดยใช้เครื่องแยกของเหลวสมรรถนะสูง (ภาคผนวก ก-20)
- วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่ง (ภาคผนวก ข-3)
- วัดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสารละลายน้ำผึ้ง (ภาคผนวก ข-7)

1.3 คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์

ตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำผึ้งลำไย น้ำผึ้งสาบเสือ และน้ำผึ้งขี้ไก่ย่าน โดยวิธี pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (Harrigan, 1998)

ตอนที่ 2 การศึกษาระดับความเจือจางของน้ำผึ้งที่มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้ อาหารเสื่อมเสีย

ศึกษาระดับความเจือจางที่เหมาะสมในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียของน้ำผึ้งลำไย น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งขี้ไก่ย่าน และน้ำผึ้งเทียม (artificial honey) โดยทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ 7 ชนิดคือ *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida utilis*

โดยมีวิธีการเตรียมน้ำผึ้งเทียมดังนี้ (ดัดแปลงจาก Cooper *et al.*, 2002)

น้ำผึ้งเทียมมีน้ำตาลร้อยละ 83 โดยน้ำหนัก ซึ่งในการเตรียมปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะทำการชั่งน้ำตาลฟรุกโตส 40.5 กรัม น้ำตาลกลูโคส 33.5 กรัม น้ำตาลมอลโตส 7.5 กรัม และน้ำตาลซูโครส 1.5 กรัม ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในสภาวะปลอดเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1 การเตรียมน้ำผึ้งที่ระดับความเจือจางต่างๆ

การเตรียมสารละลายน้ำผึ้งความเจือจางร้อยละ 30 35 40 45 50 และ 55 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำได้ดังนี้ ตัวอย่างการเตรียมน้ำผึ้งที่ความเจือจางร้อยละ 30 โดยใช้ปิเปตดูดน้ำกลั่นปริมาตร 7 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีแล้วนำมาลดอุณหภูมิให้เหลือ 5 องศาเซลเซียส โดยนำหลอดไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง ตักน้ำผึ้งด้วยช้อนอลูมิเนียมที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาณ 3 กรัม ลงในหลอดน้ำกลั่น โดยทำในสภาวะปลอดเชื้อ ปิดฝาเกลียวแล้วนำหลอดไปเขย่าผสม ด้วยเครื่องผสมแบบหมุนวน (vortex) เป็นเวลา 1 นาที เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5±1 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทำการทดลอง ซึ่งเป็นระยะเวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมง

2.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาศึกษามีทั้งหมด 7 ชนิด คือ *Serratia marcescens* *Pseudomonas fluorescens* *Enterobacter aerogenes* *Bacillus cereus* *Micrococcus luteus* *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida utilis* เพาะเชื้อจุลินทรีย์ 1 ลูป จากอาหารแข็ง ถ่ายลงในอาหารเหลว nutrient broth หรือ yeast extract malt extract broth (ตารางที่ 11) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยทำในสภาวะปลอดเชื้อ แล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ใช้ไมโครปิเปตดูดอาหารเหลวที่มีเชื้อจุลินทรีย์มา 6 มิลลิลิตรแล้วถ่ายลงในอาหารเหลวชนิดเดิมที่มีปริมาตร 30 มิลลิลิตรอีกครั้ง ซึ่งในการบ่มเพาะจะใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกันตามอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิด ดังแสดงในตารางที่ 11

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 11 อุณหภูมิและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการบ่มจุลินทรีย์ที่ศึกษา

จุลินทรีย์	อุณหภูมิที่บ่มเพาะ (องศาเซลเซียส)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้
Serratia marcescens	25	Nutrient agar/broth
Pseudomonas fluorescens	25	Nutrient agar/broth
Enterobacter aerogene	37	Nutrient agar/broth
Bacillus cereus	37	Nutrient agar/broth
Micrococcus luteus	37	Nutrient agar/broth
Saccharomyces cerevisiae	30	Yeast extract malt extract agar/broth
Candida utilis	30	Yeast extract malt extract agar/broth

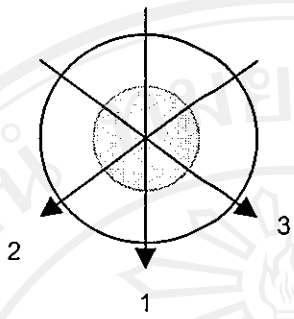
2.3 การทดสอบความไวของเชื้อที่ถูกยับยั้งด้วยน้ำผึ้ง โดยวิธี Disc diffusion assay

การทดสอบความไวของเชื้อที่ถูกยับยั้งด้วยน้ำผึ้ง โดยวิธี Disc diffusion assay ดัดแปลงจาก มาลิน จุลศิริ (2544) ทำได้โดย เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar หรือ yeast extract malt extract agar โดยเทลงในจานเลี้ยงเชื้อในสภาวะปลอดเชื้อ เตรียมก่อนนำไปใช้ 1 วัน เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง นำเชื้อที่ได้จากการเตรียมในข้อ 2.2 ซึ่งจะได้เชื้อประมาณ 10^7 cfu ต่อมิลลิลิตร มาเจือจางจนได้เชื้อประมาณ 10^5-10^6 cfu ต่อมิลลิลิตร แล้วนำเชื้อที่ได้มา streak โดยใช้สำลีพันปลายก้านไม้ที่ผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แตะเชื้อเตรียมไว้ในข้อ 2.2 บิดกับข้างหลอดให้พอหมาด แล้ว streak ให้ทั่วบนผิวหน้าอาหารแข็งในลักษณะ 3 ทิศทาง แต่ละทิศวางมุม 60 องศา

นำกระดาษซับวงกลมมาฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำผึ้งเจือจางที่เตรียมไว้ในข้อ 2.1 แล้วหยดลงบนแผ่นกระดาษซับวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ต่อ 1 แผ่นกระดาษซับวงกลม แล้วนำไปวางบนผิวหน้าอาหารแข็งที่ถ่ายเชื้อลงไปแล้ว 6 แผ่น ต่อ 1 จานเพาะเชื้อ โดยทำในสภาวะปลอดเชื้อ กลับจานเพาะเชื้อและนำไปบ่มที่อุณหภูมิดังตารางที่ 11 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากครบกำหนดเวลาแล้ว ตรวจดูบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบๆกระดาษซับวงกลม และเนื่องจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบๆ กระดาษซับวงกลมนั้นไม่สามารถควบคุมให้มีขนาดเท่ากันในทุกทิศทางได้ จึงวัดขนาดของบริเวณใสที่เกิดขึ้นในลักษณะ 3 ทิศทาง (ภาพที่ 3) ให้ได้เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 ค่า ต่อบริเวณใส 1 วง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยจะทำการวัดพาดผ่านแผ่นกระดาษซับวงกลม แล้วนำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมาหาค่าเฉลี่ย รายงานในหน่วยมิลลิเมตร



ภาพที่ 3 แสดงทิศทางการวัดบริเวณใสใน 1 วงของการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

ทำการทดลอง 3 ซ้ำการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนถ้าพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS V 10.0

ตอนที่ 3 การศึกษาการเหลือรอดของเชื้อจุลินทรีย์ ในน้ำผึ้งลำไย น้ำผึ้งสาบเสือ และน้ำผึ้งขี้ไก่ย่านที่ระดับความเจือจางและเวลาต่าง ๆ

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่พบว่าถูกยับยั้งด้วยน้ำผึ้ง ที่ความเจือจางของน้ำผึ้งชนิดต่างๆ จากการศึกษาในตอนที่ 2 มาศึกษาการรอดชีวิตในน้ำผึ้งเจือจาง ในระยะเวลาที่ 0 1 2 4 8 12 18 และ 24 ชั่วโมง

3.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่จะนำไปศึกษาการรอดชีวิตในสารละลายน้ำผึ้ง เตรียมได้เช่นเดียวกับการเตรียมเชื้อในข้อ 2.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การเตรียมน้ำผึ้งที่ระดับความเจือจางต่างๆ เพื่อเติมเชื้อจุลินทรีย์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

เตรียมน้ำผึ้งที่ระดับความเจือจางต่างปริมาตร 45 มิลลิลิตร เพื่อนำไปเติมเชื้อจุลินทรีย์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ดัดแปลงจาก Taromina *et al.*, 2001) แล้วนำมาทดสอบการรอดชีวิตในน้ำผึ้งที่ระดับความเจือจางต่างๆ โดยใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ผสมกับน้ำผึ้งที่สัดส่วนต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงสัดส่วนปริมาณน้ำผึ้งและน้ำกลั่นในการเตรียมน้ำผึ้ง

ความเจือจาง (ร้อยละ)*	ปริมาณน้ำผึ้ง (กรัม)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
30	15.0	30
35	17.5	27.5
40	20.0	25
45	22.5	22.5
50	25.0	20
55	27.5	17.5

* ที่ระดับความเจือจางต่างๆ เตรียมน้ำผึ้ง 45 มิลลิลิตร และเติมเชื้อ 5 มิลลิลิตร

3.3 การถ่ายเชื้อจุลินทรีย์

ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้ไมโครปิเปตดูดเชื้อที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำมาถ่ายลงในสารละลายน้ำผึ้งที่ระดับความเจือจางต่างๆจากการเตรียมในข้อ 3.2 ให้ได้น้ำผึ้งเจือจางผสมเชื้อจุลินทรีย์ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิด ดังตารางที่ 11 แล้วตรวจนับจำนวนที่เหลือรอดทุก 0 1 2 4 8 12 18 และ 24 ชั่วโมงด้วยวิธี surface spread plate

3.4 การตรวจนับจำนวนเชื้อที่เหลือรอดโดยวิธี surface spread plate

3.4.1 เตรียมอาหารแข็ง nutrient agar และ yeast extract malt extract agar โดยเทลงในจานเลี้ยงเชื้อที่สภาวะปลอดเชื้อ ทิ้งไว้ 1 วัน เพื่อผิวหน้าอาหารแห้งก่อนนำมาศึกษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.2 ตรวจนับจำนวนเชื้อที่เหลือรอดในสารละลายน้ำผึ้งจากขั้นตอนที่ 3.2 ที่เวลา 0 1 2 4 8 12 18 และ 24 ชั่วโมง โดยนับจากเวลาที่ถ่ายเชื้อลงในสารละลายน้ำผึ้ง ด้วยวิธี surface spread plate โดยใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายน้ำผึ้งที่ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ลงไปแล้วมา 0.1 มิลลิลิตร แล้วนำมาถ่ายลงบนผิวหน้าอาหารแข็งที่เตรียมไว้จากข้อ 3.4.1 ใช้แท่งแก้วงอ ปราศจากเชื้อ spread ลงบนผิวหน้าอาหารแข็งในเชื้อกระจายทั่วจานเพาะเชื้อ โดยทำในสภาวะปลอดเชื้อ แล้วนำจานเพาะเชื้อเข้าบ่มตามอุณหภูมิที่เหมาะสม (Harrigan, 1998) ตามตารางที่ 11

ทำการทดลอง 2 ซ้ำการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนถ้าพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS V 10.0

ตอนที่ 4 การศึกษาสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำผึ้งที่ผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อน

การศึกษาสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำผึ้งที่ผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อน เป็นการนำน้ำผึ้งที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ จากการศึกษาในตอนที่ 3 มาผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 และ 71 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และ 1 นาที ตามลำดับ

4.1 การให้ความร้อนแก่น้ำผึ้ง

ชั่งน้ำผึ้ง 100 กรัม ใส่ในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 100 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิทแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด จนวัดอุณหภูมิของน้ำผึ้งได้ 60 องศาเซลเซียส ลดระดับความร้อนให้อุณหภูมิของน้ำผึ้งคงอยู่ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาดังกล่าว นำขวดแก้วบรรจุน้ำผึ้งแช่ลงในอ่างน้ำเย็นทันทีเพื่อลดอุณหภูมิลงให้เหลือประมาณ 30 องศาเซลเซียส ทำซ้ำในกรรมวิธีข้างต้น แต่เพิ่มอุณหภูมิเป็น 71 องศาเซลเซียส และคงไว้เป็นเวลา 1 นาที เพื่อใช้สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป (Krell, 1998)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำผึ้งที่ผ่านการให้ความร้อน

นำน้ำผึ้งที่ผ่านการให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 60 และ 71 องศาเซลเซียส มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยเลือกศึกษาในจุลินทรีย์ที่ไวต่อการยับยั้งด้วยน้ำผึ้งที่ไม่ผ่านความร้อน จากการศึกษาในตอนที่ 3 ด้วยวิธี disc diffusion โดยมีวิธีการเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.2-3.4 ทำการทดสอบที่ระดับความเจือจางของน้ำผึ้งที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (จากการศึกษาในตอนที่ 2) โดยวัดการเกิดบริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รายงานผลเปรียบเทียบกับการทดสอบด้วยน้ำผึ้งที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน

ทำการทดลอง 3 ซ้ำการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนถ้าพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS V 10.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved