บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบ

หอยเป๋าฮื้อ

หอยเป๋าฮื้อชนิด *Haliotis asinina* L. ขนาดน้ำหนักรวมเปลือกประมาณ 25-30 กรัมต่อตัว จากฟาร์มหอยเป๋าฮื้ออันดามัน (Andaman Abalone Farm) จังหวัดตรัง

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

กรดซัลฟิวริก (J.T. Baker, USA)	(A.R.)
กรดบอริก (Univa, Ajax Finechem, Australia)	(A.R.)
เซเลเนียมรีเอเจนท์มิกซ์เจอร์ (Merck, Darmstadt, Germany)	(A.R.)
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Univa, Ajax Finechem, Australia)	(A.R.)
โซเดียมคาร์บอเนต (Univa, Ajax Finechem, Australia)	(A.R.)
โบรโมครีซอลกรีน (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy)	(A.R.)
ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy)	(A.R.)
โพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลท (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy)	(A.R.)
เมธทิลเรด (Merck, Darmstadt, Germany)	(A.R.)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน

คอปเปอร์ซัลเฟต (Univa, Ajax Finechem, Australia)	(A.R.)
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Univa, Ajax Finechem, Australia)	(A.R.)
ไดเมธทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ (Fluka Biochemika, USA)	(A.R.)
ไฮดรอกซีโพรลีน (Fluka Biochemika, USA)	(A.R.)
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Panreac, England)	(A.R.)
โพรพิลแอลกอฮอล์ (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy)	(A.R.)
กรดซัลฟิวริก	(A.R.)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์

โซเดียมคลอไรด์ (Univa, Ajax Finechem, Australia) (A.R.)

เพลตเคาน์อะการ์ (Merck, Darmstadt, Germany) (A.R.)

คุกมีตมีเดียม (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India) (A.R.)

ไอร์ออนซัลไฟด์อะการ์ (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India) (A.R.)

ทริปโตน(Bacto™ Tryptone, Bacton Dickinson and company, France) (A.R.)

ยีสต์เอกซแตรกต์ (Merck, Darmstadt, Germany) (A.R.)

แอล-ฮิสติดีนโมโนไฮโดรคลอไรด์ (Fluka Biochemika, USA) (A.R.)

อะการ์ (Univa, Ajax Finechem, Australia) (A.R.)

แคลเซียมคาร์บอเนต (Fluka Biochemika, USA) (A.R.)

บรอมครีซอลเพอร์เพิล (Merck, Darmstadt, Germany) (A.R.)

แอลกอฮอล์ 70%

แอลกอฮอล์ 95%

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ฮิสตามีน

เอทธิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์

(Univa, Ajax Finechem, Australia) (A.R.)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Univa, Ajax Finechem, Australia) (A.R.)

สารเคมีในชุดทดสอบฮิสตามีน (Kikkoman, Kikkoman Corporation, Japan)

colorimetric reagent ที่ประกอบด้วย tetrazolium salt และ 1-methoxy PMS

enzymatic reagent ได้แก่ เอนไซม์ histamine dehydrogenase

tris-HCl buffer solution

histamine standard solution

สารเคมีที่ใช้ในการผลิตหอยเป๋าฮื้อในน้ำเกลือบรรจุรีทอร์ตเพาช์

เกลือแกง

กรดซิตริก (food grade)

โซเดียมไตรพอลีฟอสเฟต (food grade)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ Degree of browning

Trichloroacetic acid (Merck, Darmstadt, Germany) (A.R.)

วัสดุและอุปกรณ์

วัสดุที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์

Stomacher bag

จานเพาะเชื้อชนิดพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร × 15 มิลลิเมตร

วัสดุที่ใช้ในการผลิตหอยเป๋าฮื้อในน้ำเกลือบรรจุรีทอร์ตเพาช์

รีทอร์ตเพาช์ PET12/NYLON15/ALU7/CPP70 ขนาด 130 มิลลิเมตร × 170 มิลลิเมตร

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

เครื่องย่อยโปรตีน (Buchi รุ่น K-424, Switzerland)

เครื่องกลั่นไนโตรเจน (Buchi รุ่น B-324, Switzerland)

เครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo รุ่น AB204, USA)

ตู้อบลมร้อน (Memmert model 600, Germany)

เตาเผา (Muffle Furnace) (Fisher Sciencetific รุ่น Isotherm, USA)

กระดาษกรอง Whatmam เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร

ถ้วยอะลูมิเนียม

ครูซิเบิล (crucible)

เดซิเคเตอร์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ฮิสตามีน

ชุดทดสอบฮิสตามีน (KIKKOMAN, Kikkoman Corporation, Japan)

เครื่องปั่นผสม (Panasonic รุ่น MX-795N, Malaysia)

เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น BP3100s, Ireland)

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Jasco UV/VIS Spectrophotometer รุ่น V-530, USA)

เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Thermo ICE รุ่น ICE Multi RF, USA)

หลอดเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงขนาด 80 มิลลิลิตร

หลอดทดลองพลาสติก

ปิเปต ขนาด 0.1 และ 1 มิลลิลิตร

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บรักษาหอยเป๋าฮื้อสด เพื่อศึกษาผลของวิธีการจัดการ อุณหภูมิและเวลาการเก็บรักษาต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางจุลชีววิทยาและทางกายภาพ

กล่องโฟม

ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิที่ 10°C (Gallenkamp Cooled, Germany)

เครื่องวัดพีค่าความเป็นกรดด่าง (Cyberscan รุ่น 1000pH, USA)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์

เครื่อง incubator (Memmert, Germany) สำหรับอุณหภูมิ 37°C

เครื่อง incubator (Memmert, Germany) สำหรับอุณหภูมิ 55°C

เครื่อง autoclave (Tomy SS-320, England)

เครื่อง stomacher (AES Laboratorire, France)

เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น BP3100s, Ireland)

ปิเปต ขนาด 0.1 และ 1 มิลลิลิตร

ตะเกียงแอลกอฮอล์

สเปรดเดอร์ (spreader)

หลอดทดลองขนาด 13 มิลลิเมตร × 125 มิลลิเมตร พร้อมฝาปิด

ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ Degree of browning

เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น BP3100s, Ireland)

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Jasco UV/VIS Spectrophotometer รุ่น V-530, USA)

เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Thermo ICE รุ่น ICE Multi RF, USA)

หลอดเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงขนาด 80 มิลลิลิตร

เครื่อง homogenizer (Ystral รุ่น 79282, Netherland)

ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร

กระบอกตวง

กรวย

กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ Water-holding capacity

เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo รุ่น AB204, USA)

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Jasco UV/VIS Spectrophotometer รุ่น V-530, USA)

เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Thermo ICE รุ่น ICE Multi RF, USA)

หลอดเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงขนาด 80 มิลลิลิตร

กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน

เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo รุ่น AB204, USA)

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Jasco UV/VIS Spectrophotometer รุ่น V-530, USA)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert รุ่น D-91126, Germany)

ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร

หลอดทดลอง

ปิเปต ขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักเนื้อ

ตะแกรงขนาด 2.5 มิลลิเมตร × 2.5 มิลลิเมตร

เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น BP3100s, Ireland)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาเนื้อสัมผัส

เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture Analyzer รุ่น TA-XT2, Stable Micro System, England)

ชุดใบมีดเดี่ยว (Knife/Guillotine blade)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตหอยเป๋าฮื้อในน้ำเกลือบรรจุรีทอร์ตเพาช์

เครื่องปิดผนึกถุง (Webomatic รุ่น Hansastr.199, Germany)

หม้อฆ่าเชื้อ (HISAKA simulator retort รุ่น RCS-40RTGN, Japan)

ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

การเตรียมวัตถุดิบ

หอยเป๋าฮื้อพันธุ์ *Haliotis asinina* ขนาดน้ำหนักประมาณ 25-30 กรัมต่อตัว และมีความหนาของตัวหอยประมาณ 1 เซนติเมตร จากฟาร์มหอยเป๋าฮื้ออันดามัน จังหวัดตรัง บรรจุในถุงพลาสติกอัดอากาศใส่ในกล่องโฟมบรรจุน้ำแข็ง ขนส่งทางเครื่องบิน ระยะเวลาขนส่งไม่เกิน 6 ชั่วโมง เมื่อมาถึงห้องปฏิบัติการแปรรูปอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แช่เยือกแข็งอย่างรวดเร็วโดยใช้เครื่องแช่เยือกแข็งแบบไครโอจินิก (Cryo-Test Chamber Nitrogen Freezer model F831059E, Allentown, Penna, USA) บรรจุในถุงพลาสติกโพลีเอทธิลีนและปิดผนึกถุงแบบสุญญากาศ นำไปเก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -31°C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

เมื่อจะใช้หอยเป๋าฮื้อนี้ จึงนำถุงที่บรรจุหอยมาแช่ในน้ำประปาที่อุณหภูมิห้องเพื่อละลายน้ำแข็ง แล้วแกะเปลือกและเอาเครื่องในออก ล้างทำความสะอาด ก่อนนำไปใช้ต่อไป หอยที่แกะเปลือกและเอาเครื่องในออกแล้วมีน้ำหนักประมาณ 12-15 กรัมต่อตัว

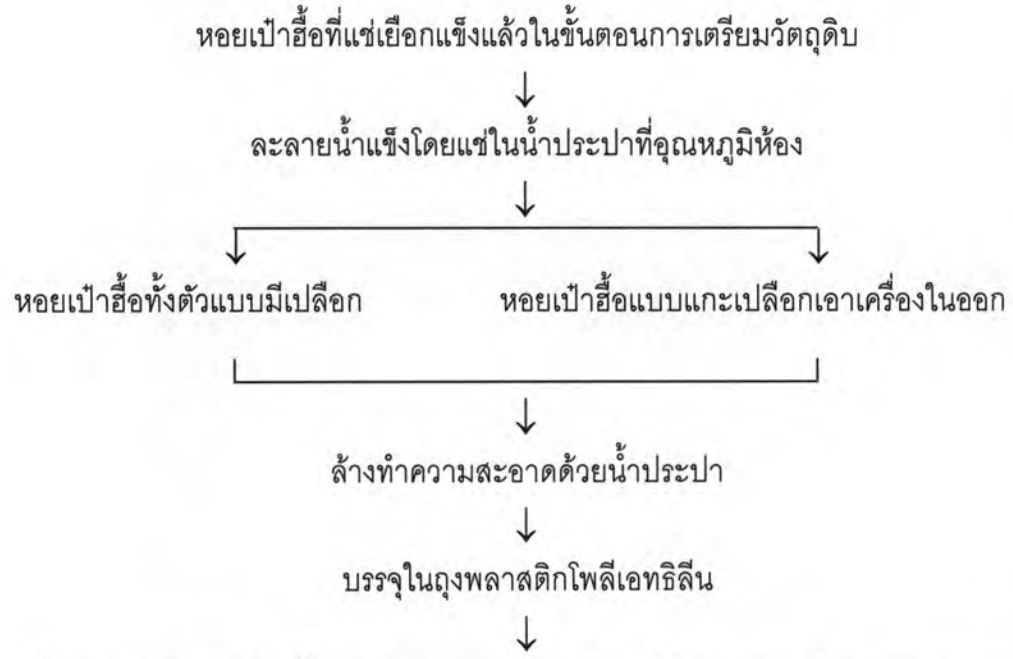
3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อสด

นำหอยเป๋าฮื้อที่ล้างทำความสะอาดแล้วมาสับให้ละเอียด วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อ ได้แก่ ปริมาณความชื้น โปรตีน เถ้า และไขมัน (AOAC, 1995) โดยวิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก.1-ก.4

3.2 ศึกษาผลของวิธีการจัดการ อุณหภูมิ และระยะเวลาการเก็บรักษาต่อการเกิดฮิสตามีนในหอยเป๋าฮื้อสด

การเตรียมหอยเป๋าฮื้อ: (แสดงในหน้าถัดไป)

การเตรียมหอยเป๋าฮื้อ: (ต่อ)



เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0°C โดยใช้น้ำแข็งกลบ บรรจุในกล่องโฟม สุ่มตรวจทุก 3 วัน เป็นเวลา 21 วัน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10°C ในตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ สุ่มตรวจทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน

รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมหอยเป๋าฮื้อเพื่อใช้ศึกษาผลของวิธีการจัดการ อุณหภูมิ และระยะเวลาการเก็บรักษาต่อการเกิดฮิสตามีนในหอยเป๋าฮื้อสด

ตรวจวิเคราะห์ดังนี้

3.2.1 **การเปลี่ยนแปลงค่า** pH

นำตัวอย่างหอยเป๋าฮื้อมาปั่นให้ละเอียด วัดค่า pH ที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ pH Meter

3.2.2 **การเปลี่ยนแปลงลักษณะเนื้อสัมผัส**

นำหอยเป๋าฮื้อมาวัดค่าความแน่นเนื้อ (firmness) ด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture Analyzer TA-XT2) โดยใช้ cutting test ตัดตรงตำแหน่งกึ่งกลางตามความยาวของเนื้อหอยเป๋าฮื้อที่อัตราเร็วหัววัด 2 มิลลิเมตร/วินาที โดยค่า firmness คือค่าของงาน (กรัม.มิลลิเมตร) ที่ใช้เพื่อตัดตัวอย่างให้ขาดออกจากกัน คำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟระหว่างค่าแรง (กรัม) กับระยะทาง (มิลลิเมตร)

3.2.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์

3.2.3.1 ปริมาณแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ (aerobic plate count)

ตามวิธี AOAC (1995) วิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ข.1

3.2.3.2 ปริมาณแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ฮิสติดีนดีคาร์บอกซีเลส (histidine decarboxylase bacteria)

ตามวิธีของ Niven และคณะ (1981) วิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ข.2

3.2.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณฮิสตามีน

วิเคราะห์ปริมาณฮิสตามีนในหอยเป๋าฮื้อโดยใช้ชุดทดสอบฮิสตามีน (histamine test kits) ของบริษัท Kikkoman Corporation ประเทศญี่ปุ่น (วิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ค)

วางแผนการทดลองแบบ 2×7 factorial in Completely Randomized Design (CRD) (โดยแบ่งการเก็บหอยเป๋าฮื้อที่แต่ละอุณหภูมิเป็น 2 แบบ คือ แบบทั้งตัวและแบบแกะเปลือกเอาเครื่องในออก และจำนวนวันที่ตรวจสอบ 7 วัน) ข้อ 3.2.1 วิเคราะห์ 3 ซ้ำ ข้อ 3.2.2 วิเคราะห์ 7 ซ้ำ ข้อ 3.2.3 วิเคราะห์ 2 ซ้ำ และข้อ 3.2.4 วิเคราะห์ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1992) ที่ระดับความน่าจะเป็น (α) 0.05

3.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการให้ความร้อนต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของหอยเป๋าฮื้อ

การเตรียมหอยเป๋าฮื้อ:

นำหอยเป๋าฮื้อมาแกะเปลือกและเอาเครื่องในออกให้เหลือแต่ส่วนของเนื้อเท้า ล้างให้สะอาด แช่ในสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 0.15% นาน 10 นาที จากนั้นแช่ในสารละลายโซเดียมไตรพอลีฟอสเฟตความเข้มข้น 10% อีก 60 นาที อุณหภูมิระหว่างการแช่ประมาณ 2°-5°C

(ดัดแปลงจากวิธีของ สมพงษ์ คูประมงอารักษ์, 2534; Crapo และ Crawford, 1991) เมื่อแช่เสร็จแล้วนำหอยมาล้างน้ำและทิ้งให้สะเด็ดน้ำก่อนนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

บรรจุเนื้อหอยที่เตรียมเสร็จลงในรีทอร์ตเพาช์ PET12/NYLON15/ALU7/CPP70 ขนาด 130 มิลลิเมตร × 170 มิลลิเมตร จำนวน 3-4 ตัวต่อถุง ปิดผนึกถุงแบบสุญญากาศ นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80°C โดยใช้อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ และที่อุณหภูมิ 100°C และ 120°C ให้ความร้อนผ่านน้ำมันพืชในหม้อทอดควบคุมอุณหภูมิ เป็นระยะเวลา 2 4 6 8 10 15 20 30 60 120 180 และ 240 นาที วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงดังนี้

3.1.1 **ปริมาณ** cooking loss (Hatae และคณะ, 1996)

ชั่งน้ำหนักเนื้อหอยเป้าฮื้อก่อนและหลังการให้ความร้อน คำนวณปริมาณ cooking loss ตามสมการที่ (1)

$$\text{cooking loss (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักหอยเป้าฮื้อก่อนให้ความร้อน - หลังให้ความร้อน (กรัม)}}{\text{น้ำหนักหอยเป้าฮื้อก่อนให้ความร้อน (กรัม)}} \times 100 \quad \ldots\ldots (1)$$

3.1.2 **Degree of browning** (Chiou และคณะ, 2004)

ชั่งน้ำหนักเนื้อหอยเป้าฮื้อที่ผ่านการให้ความร้อนและปั่นละเอียดแล้วมา 5 กรัม ปั่นผสมกับสารละลายไตรคลอโรอะซิติกแอซิด (trichloroacetic acid) ความเข้มข้น 7% ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ด้วยเครื่อง homogenizer (13000 rpm/min) เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4000×g นาน 20 นาที กรองของเหลวส่วนใสเก็บไว้ และนำส่วนที่เป็นของแข็งมาสกัดซ้ำอีก 2 รอบ รวมของเหลวส่วนใสทั้งหมดที่ได้ แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายไตรคลอโรอะซิติกแอซิดความเข้มข้น 7% เพื่อให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำสารละลายสีน้ำตาลที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Jasco UV/VIS Spectrophotometer รุ่น V-530) ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (A_{420}) แสดงเป็นค่า degree of browning (A_{420}/ กรัม ตัวอย่าง)

3.3.3 **Water-Holding Capacity** (Jauregui, Regenstein, และ Baker, 1981; Ueng และ Chow, 1998)

ตัดชิ้นเนื้อหอยเป๋าฮื้อให้มีขนาดประมาณ 1×1 เซนติเมตร และชั่งน้ำหนักก่อนห่อด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่ทราบน้ำหนัก นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4500×g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ชั่งน้ำหนักกระดาษกรองหลังการหมุนเหวี่ยง คำนวณค่า water-holding capacity (WHC) ดังสมการที่ (2)

$$\text{WHC (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักกระดาษกรองหลังเซ็นตริฟิวจ์ (กรัม)} - \text{ก่อนเซ็นตริฟิวจ์ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักชิ้นตัวอย่างหอยเป๋าฮื้อ (กรัม)}} \times 100 \quad \ldots\ldots (2)$$

3.3.4 **ลักษณะเนื้อสัมผัส**

นำหอยเป๋าฮื้อมาวัดค่า toughness ด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture Analyzer TA-XT2) โดยใช้ cutting test ตัดตรงตำแหน่งกึ่งกลางความยาวของเนื้อหอย ที่อัตราเร็วของหัววัด 2 มิลลิเมตร/วินาที โดยค่า toughness คือ ค่าของงาน (กรัม.มิลลิเมตร) ที่ใช้เพื่อตัดตัวอย่างให้ขาดออกจากกัน คำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟระหว่างค่าแรง (กรัม) กับระยะทาง (มิลลิเมตร)

วางแผนการทดลองแบบ 3×12 factorial in CRD (โดยแบ่งอุณหภูมิการให้ความร้อนเป็น 3 ระดับ คือ 80°C 100°C และ 120°C และแบ่งระยะเวลาการให้ความร้อนเป็น 12 ช่วง) ข้อ 3.3.1 และ 3.3.2 วิเคราะห์ 3 ซ้ำ ข้อ 3.3.3 วิเคราะห์ 4 ซ้ำ และข้อ 3.3.4 วิเคราะห์ 7 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1992) ที่ระดับความน่าจะเป็น 0.05

3.4 การศึกษากระบวนการฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับผลิตภัณฑ์หอยเป๋าฮื้อในน้ำเกลือบรรจุรีทอร์ตเพาช์

3.4.1 การแทรกผ่านความร้อนและหาเวลาในการฆ่าเชื้อ

ขั้นตอนการเตรียมหอยเป๋าฮื้อในน้ำเกลือบรรจุรีทอร์ตเพาช์ แสดงในรูปที่ 3.2 แต่ในการบรรจุเนื้อหอยเป๋าฮื้อจะบรรจุมากกว่าน้ำหนักปกติ 10%-15% คือ ประมาณ 83-87 กรัม ในรีทอร์ตเพาช์ที่ติดตั้งเข็มวัดอุณหภูมิคู่ควบ (thermocouple) ที่ด้านข้างถุงและปลายเข็มเสียบตรง

I29065345

กลางชิ้นเนื้อหอย ติดตามการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของอาหารระหว่างการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 50 นาที โดยวางรีทอร์ตเพาช์ที่ติดตั้งเข็มวัดอุณหภูมิคู่ควบที่ด้านข้างถุง ในตำแหน่งจุดร้อนช้าที่สุดของหม้อฆ่าเชื้อ (วิธีทดลองแสดงในภาคผนวก ง) บันทึกอุณหภูมิของหม้อฆ่าเชื้อและอาหารทุก 5 วินาที จนสิ้นสุดกระบวนการให้ความร้อนและทำให้เย็น วิเคราะห์ 2 ซ้ำ นำข้อมูลการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและเวลาของผลิตภัณฑ์ที่จุดร้อนช้าที่สุดมาสร้าง heat penetration curve แล้วคำนวณหา heat penetration parameters เพื่อใช้หาเวลาในการฆ่าเชื้อ (process time) และ sterilizing value (F_0) โดยวิธี formula method ต่อไป

หอยเป๋าฮื้อสดแช่เยือกแข็ง

↓

ละลายน้ำแข็งโดยแช่ในน้ำประปาที่อุณหภูมิห้อง

↓

แกะเปลือกเอาเครื่องในออก และล้างด้วยน้ำสะอาด

↓

แช่สารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 0.15% เป็นเวลา 10 นาที
(อุณหภูมิระหว่างการแช่ประมาณ 2°C-5°C)

↓

แช่สารละลายโซเดียมโซเดียมไตรพอลีฟอสเฟตความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 60 นาที
(อุณหภูมิระหว่างการแช่ประมาณ 2°C-5°C)

↓

ลวกหอยเป๋าฮื้อในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 70°C-80°C เป็นเวลา 1 นาที

↓

บรรจุเนื้อหอยเป๋าฮื้อ 75 กรัม ลงในรีทอร์ตเพาช์ (บรรจุประมาณ 50% ของน้ำหนักสุทธิ)

↓

เติมน้ำเกลือความเข้มข้น 2% อุณหภูมิประมาณ 70°C-80°C
จนมีน้ำหนักสุทธิเท่ากับ 150 กรัม

↓

ปิดผนึกถุงแบบสุญญากาศ

↓

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อฆ่าเชื้อ

รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการผลิตหอยเป๋าฮื้อในน้ำเกลือบรรจุรีทอร์ตเพาช์

3.4.2 จุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์หอยเป๋าฮื้อในน้ำเกลือบรรจุรีทอร์ตเพาช์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อไม่เพียงพอ

ผลิตหอยเป๋าฮื้อในน้ำเกลือบรรจุรีทอร์ตเพาช์ตามรูปที่ 3.2 เพื่อให้ได้ F_0 เท่ากับ 2 นาที ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 114°C เป็นเวลา 12 นาที อุณหภูมิเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 50°C (เวลาการฆ่าเชื้อได้จากการคำนวณตามวิธี General) นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ *Clostridium botulinum* (Solomon และคณะ, 2001) (วิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ข.3) และ *Bacillus stearothermophilus* (Olson และ Sorrells, 2001) (วิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ข.4) ตรวจวิเคราะห์ทุกเดือน ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิประมาณ 23°C-33 °C) เป็นเวลา 6 เดือน วิเคราะห์ 2 ซ้ำ

3.4.3 ผลของอุณหภูมิเริ่มต้นของอาหารและอุณหภูมิของหม้อฆ่าเชื้อที่มีผลต่อภาวะการฆ่าเชื้อหอยเป๋าฮื้อในน้ำเกลือบรรจุรีทอร์ตเพาช์

ผลิตหอยเป๋าฮื้อในน้ำเกลือบรรจุรีทอร์ตเพาช์ตามรูปที่ 3.2 โดยกำหนดให้ F_0 เท่ากับ 4 นาที เมื่ออุณหภูมิเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 50°C ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 114°C และ 121°C เป็นเวลา 23 และ 7 นาที ตามลำดับ และเมื่ออุณหภูมิเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 70°C (ปรับอุณหภูมิโดยใช้น้ำเกลือต้มเดือด) ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 114°C และ 121°C เป็นเวลา 22 และ 6 นาที ตามลำดับ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อทั้ง 4 ภาวะมาวิเคราะห์คุณภาพดังนี้

3.4.3.1 น้ำหนักเนื้อ (drained weight)

เทผลิตภัณฑ์จากถุงให้กระจายทั่วกันบนตะแกรงที่ทราบน้ำหนัก วางตะแกรงเอียงเป็นมุมประมาณ 17-20 องศา ทิ้งไว้เช่นนี้นาน 2 นาที เพื่อแยกของเหลวออกจากเนื้อ จากนั้นซับของเหลวที่ติดก้นตะแกรง แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก (มอก. 89, 2528) คำนวณน้ำหนักเนื้อ (drained weight) ตามสมการที่ (3)

$$\text{น้ำหนักเนื้อ (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักเนื้อหอยเป๋าฮื้อหลังแยกของเหลวออกแล้ว}}{\text{น้ำหนักสุทธิของผลิตภัณฑ์ (กรัม)}} \times 100 \quad \text{..... (3)}$$

3.4.3.2 **Degree of browning** (Chiou และคณะ, 2004)

การวิเคราะห์ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2

3.4.3.3 ปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ (soluble collagen)

3.4.3.3.1 ขั้นตอนการย่อย

(Wattanachant, Benjakul, และ Ledward, 2005)

นำเนื้อหอยเป๋าฮื้อปั่นละเอียด 2 กรัม เติม Ringer's solution (32.8 mM NaCl, 1.5 mM KCl, และ 0.5 mM $CaCl_2$) ความเข้มข้น 25% ปริมาตร 8 มิลลิลิตร แล้วให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อละลายส่วนที่เป็นเจลาตินหรือคอลลาเจนที่ละลายได้ (soluble collagen) ในเนื้อหอยเป๋าฮื้อที่ผ่านการให้ความร้อนออกมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 2300×g นาน 30 นาที แยกของเหลวส่วนใสออกมาใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำส่วนที่เป็นตะกอนมาสกัดซ้ำอีกครั้ง แล้วแยกของเหลวส่วนใสที่ได้ไปรวมกับของเหลวที่แยกได้ครั้งแรก จากนั้นนำส่วนที่เป็นของแข็งและของเหลวแต่ละส่วนมาย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 130°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้จากการย่อยไปวิเคราะห์ปริมาณ hydroxyproline ต่อไป

3.4.3.3.2 วิเคราะห์ปริมาณ hydroxyproline ในเนื้อหอยเป๋าฮื้อ

(Leach, 1960)

ปิเปตสารละลายที่ได้จากขั้นตอนการย่อย (ข้อ 3.4.3.3.1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายที่ได้ 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน นำสารละลายนี้ไปให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ 40°C จนกระทั่งอุณหภูมิภายในหลอดทดลองถึง 40°C (3-5 นาที) จึงเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 6% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าผสมทันทีและให้ความร้อนนาน 10 นาที และในระหว่างการให้ความร้อนนำหลอดทดลองขึ้นมาเขย่าเป็นครั้งคราว เมื่อครบกำหนดจึงทำให้เย็น และเติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 3 โมลาร์ 4 มิลลิลิตร และสารละลายไดเมธิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ความ

เข้มข้น 5% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดทดลอง แล้วนำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 16 นาที ทำให้เย็น แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Jasco UV/VIS Spectrophotometer รุ่น V-530) ที่ความยาวคลื่น 555 นาโนเมตร

นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณปริมาณ hydroxyproline (ไมโครกรัม/2มิลลิลิตร) จากกราฟมาตรฐาน (แสดงในภาคผนวก ฉ) แล้วคำนวณปริมาณ hydroxyproline (กรัม/100 กรัม) ตามสมการที่ (4)

$$\text{ปริมาณ hydroxyproline (กรัม/100 กรัม)} = \frac{(h \times V \times 2.5)}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \quad \ldots\ldots (4)$$

h คือ ปริมาณ hydroxyproline (ไมโครกรัม / 2 มิลลิลิตร) ที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

V คือ ปริมาตรของสารละลายก่อนย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก (ส่วนของเหลว) หรือ ปริมาตรของสารละลายหลังย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก (ส่วนที่เป็นตะกอนของแข็ง)

คำนวณปริมาณคอลลาเจน (กรัม/100กรัม) ตามสมการที่ (5) โดยให้ปริมาณ hydroxyproline คิดเป็น 7.52% ของปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ (soluble collagen) และคิดเป็น 7.25% ของปริมาณคอลลาเจนที่ละลายไม่ได้ (insoluble collagen) (Cross และคณะ, 1973) แล้วคำนวณปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ (%ปริมาณคอลลาเจนทั้งหมด) (Wattanachant และคณะ, 2005)

$$\text{ปริมาณคอลลาเจน (กรัม/100 กรัม)} = \frac{\text{ปริมาณ hydroxyproline (กรัม/100 กรัม)} \times 100}{7.25^{*} \text{ หรือ } 7.52^{**}} \quad \ldots\ldots (5)$$

* ใช้ในการคำนวณปริมาณคอลลาเจนที่ละลายไม่ได้ในเนื้อหอยเป๋าฮื้อ

** ใช้ในการคำนวณปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ในเนื้อหอยเป๋าฮื้อ

3.4.3.4 ลักษณะเนื้อสัมผัส

นำหอยเป๋าฮื้อมาวัดค่า toughness ด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture Analyzer TA-XT2) โดยใช้ cutting test ตัดตรงตำแหน่งกึ่งกลางตามความยาวของเนื้อหอยเป๋าฮื้อ

ที่อัตราเร็วของหัววัด 2 มิลลิเมตร/วินาที โดยค่า toughness คือ ค่าของงาน (กรัม.มิลลิเมตร) ที่ใช้เพื่อตัดตัวอย่างให้ขาดออกจากกัน คำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟระหว่างค่าแรง (กรัม) กับระยะทาง (มิลลิเมตร)

3.4.3.5 คุณภาพทางประสาทสัมผัส

ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านสี กลิ่น เนื้อสัมผัส และความชอบรวมด้วยแบบทดสอบชนิด Hedonic scale แบ่งคะแนนเป็น 7 ระดับ โดยคะแนน 7 เป็นระดับที่ชอบมาก และคะแนนต่ำกว่า 4 เป็นระดับที่ไม่ยอมรับผลิตภัณฑ์ ส่วนคะแนนลักษณะคุณภาพมีเกณฑ์ 1-5 คะแนน ได้แก่ สี (1 หมายถึงสีน้ำตาลเข้ม - 5 หมายถึงสีขาว) ความยืดหยุ่น (1 หมายถึงไม่มีความยืดหยุดเลย - 5 หมายถึงยืดหยุดมาก) ความเหนียว (1 หมายถึงเปื่อยมากจนละ - 5 หมายถึงเหนียวปานกลาง) และความชุ่มน้ำ (1 หมายถึงแห้งมาก - 5 หมายถึงชุ่มน้ำมาก) (ตัวอย่างแบบทดสอบแสดงในภาคผนวก ช) ใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝน 10 คน

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยในข้อ 3.4.3.1 วิเคราะห์ 2 ซ้ำ ข้อ 3.4.3.2 วิเคราะห์ 7 ซ้ำ ข้อ 3.4.3.3 วิเคราะห์ 3 ซ้ำ ข้อ 3.4.3.4 วิเคราะห์ 7 ซ้ำ และข้อ 3.4.3.5 วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) วิเคราะห์ 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1992) ที่ระดับความน่าจะเป็น 0.05

เลือกภาวะการฆ่าเชื้อที่ดีที่สุดมาผลิตหอยเป๋าฮื้อในน้ำเกลือบรรจุรีทอร์ตเพาช์ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางจุลชีววิทยาและทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน โดยพิจารณาจากคะแนนความชอบสูงสุดที่ผู้ทดสอบมีต่อผลิตภัณฑ์

3.5 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลิตภัณฑ์หอยเป๋าฮื้อในน้ำเกลือบรรจุรีทอร์ตเพาช์ตลอดอายุการเก็บรักษา 6 เดือน

ผลิตหอยเป๋าฮื้อในน้ำเกลือบรรจุรีทอร์ตเพาช์ตามรูปที่ 3.2 โดยใช้ภาวะการฆ่าเชื้อที่เลือกได้จากข้อ 3.4 และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิประมาณ 23°C-33°C) เป็นเวลา 6 เดือน ประเมินคุณภาพของผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษาในแต่ละเดือนดังนี้

3.5.1 คุณภาพทางจุลชีววิทยา

ตรวจสอบลักษณะภายนอกของบรรจุภัณฑ์ว่ามีลักษณะที่ผิดปกติหรือไม่ เช่น บวม รั่ว เป็นต้น แบ่งตัวอย่างเป็นสองส่วนนำไปบ่มเชื้อในตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C-37°C เป็นเวลา 14 วัน และที่อุณหภูมิ 50°C-55°C เป็นเวลา 7 วัน ในกรณีที่มีลักษณะผิดปกติเกิดขึ้นระหว่างการบ่มเชื้อไม่ต้องนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ต่อ นำผลิตภัณฑ์ที่บ่มครบกำหนดแล้วไปวิเคราะห์จุลินทรีย์ flat sour, thermophilic anaerobes, putrefactive anaerobes และ sulfide spoilage (มอก.335 เล่ม 1, 2533) วิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ข.5-ข.8

3.5.2 คุณภาพทางประสาทสัมผัส

ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านสี กลิ่น เนื้อสัมผัส และความชอบรวม ด้วยแบบทดสอบชนิด Hedonic scale แบ่งคะแนนเป็น 7 ระดับ โดยคะแนน 7 เป็นระดับที่ชอบมาก และคะแนนต่ำกว่า 4 เป็นระดับที่ไม่ยอมรับผลิตภัณฑ์ ส่วนคะแนนลักษณะคุณภาพมีเกณฑ์ 1-5 คะแนน ได้แก่ สี (1 หมายถึงสีน้ำตาลเข้ม - 5 หมายถึงสีขาว) ความยืดหยุ่น (1 หมายถึงไม่มีความยืดหยุดเลย - 5 หมายถึงยืดหยุดมาก) ความเหนียว (1 หมายถึงเปื่อยมากจนเละ - 5 หมายถึงเหนียวปานกลาง) และความชุ่มน้ำ (1 หมายถึงแห้งมาก - 5 หมายถึงชุ่มน้ำมาก) (ตัวอย่างแบบทดสอบแสดงในภาคผนวก ช) ใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝน 10 คน วิเคราะห์ 2 ซ้ำ

วางแผนการทดลองแบบ RCBD วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1992) ที่ระดับความน่าจะเป็น 0.05