บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือ และวัสดุอุปกรณ์

1.1 เครื่องบดละเอียด (Hobart 4146)

1.2 เครื่องสับนวด (Eduard Mülier&Söhne MK 70/1 special)

1.3 เครื่องอัดหมูยอ (Mülle SAARBÜCKEN-W Germany)

1.4 กระบอกโลหะพร้อมตัวยึด

1.5 หม้อต้มไฟฟ้า (Hersteller Bayha&Streakbein G.m.b.H type C)

1.6 อุปกรณ์อิเล็กโทรนิกส์สำหรับแปลงสัญญาณและบันทึกข้อมูล และหัววัดอุณหภูมิ (Data logger and thermocouple, Ellab CTF 9004)

1.7 เทอร์โมมิเตอร์แบบดิจิตอล (Digital Thermometer, Lutron HT-3006)

1.8 หม้อนึ่งความดัน (Hirayama HA 3D)

1.9 ตู้อบความร้อน (Precision 4EG)

1.10 ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบธรรมดา (Heraeus B12, Memmert BM 800)

1.11 ตู้บ่มเพาะเชื้อไร้ออกซิเจน (Hirayama fab)

1.12 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Precision 66851)

1.13 ตู้แช่แข็ง

1.14 ห้องเย็น อุณหภูมิ 4 – 8 องศาเซลเซียส

1.15 ตู้เย็น (Mitsubishi MR-F24JDX-GY, MR-F46E-GY)

1.16 เครื่องตีบดอาหาร (Lab-blender 400)

1.17 เครื่องเหวี่ยงผสม (Genie 2)

1.18 เครื่องปั่นผสม (National MX347N)

1.19 เครื่องนับโคโลนี (Hellige)

1.20 เครื่องโครมาโทกราฟชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง (HPLC)

1.21 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (SCHOTT GERÄTE CG 804)

1.22 ชุดเครื่องกลั่น

2. เคมีภัณฑ์

2.1 Potassium dihydrogen phosphate (Univar)

2.2 Sodim pyruvate (Fluka)

2.3 Sodium choride (Merck)

2.4 Neomycin thiosulfate trihydrate (Fluka)

2.5 Methanol (Merck)

2.6 Ammonium acetate (Merck)

2.7 Sodium benzoate AR grade (Merck)

2.8 Sodium benzoate (Carlo erba)

2.9 Magnesium sulfate heptahydrate (Carlo erba)

2.10 Sulfuric acid (Merck)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 Plate count agar (PCA, Difco)

3.2 Mannitol salt agar (MS, Difco)

3.3 Tryptic soy broth (TSB, BD)

3.4 Xylose lysine decarboxylase agar (XLD. Difco)

3.5 Bismuth sulfite agar (BS, Difco)

3.6 Tetrathionate broth (TTB, Difco)

3.7 Selenite cystine broth (SB, Difco)

3.8 *Clostridium welchii* agar (CW, Eiken)

3.9 Cooked meat medium (Difco)

3.10 Lauryl sulphate tryptose broth (LST, Difco)

วิธีการดำเนินการทดลอง

การทดลองประกอบด้วย 3 ส่วนคือ การศึกษาอุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการต้มหมูยอ การศึกษาผลของการเติมโซเดียมเบนโซเอตต่อคุณลักษณะของหมูยอ และการศึกษาผลของการเติมโซเดียมเบนโซเอตต่ออายุการเก็บรักษาของหมูยอ ดังนี้

I20977 3270

1. การศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการต้มหมูยอ

การทดลองในครั้งนี้จะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนคือ การศึกษาสภาวะเบื้องต้นของกระบวนการฆ่าเชื้อในหมูยอ และการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการต้มหมูยอ ณ อุณหภูมิที่กำหนด

1.1 การศึกษาสภาวะเบื้องต้นของกระบวนการฆ่าเชื้อในหมูยอ

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการต้มหมูยอ จัดเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อคุณภาพด้านจุลินทรีย์เพื่อให้หมูยอที่ผลิตขึ้นมีคุณภาพด้านจุลินทรีย์อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน และมีลักษณะทางกายภาพที่ดี ซึ่งมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

1.1.1 การเตรียมตัวอย่างหมูยอ

ทำการผลิตหมูยอโดยใช้สูตรดัดแปลงจากกรมปศุสัตว์ (2536) และผลิตตามวิธีของกรมปศุสัตว์ (2536) ในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ การสับผสม และบรรจุหมูยอลงในถุงพลาสติกในกระบอกโลหะ ดังแสดงในภาคผนวก ก การผลิตหมูยอในขั้นตอนที่ 1 และ 2

1.1.2 การติดตั้งหัววัดอุณหภูมิ

นำหมูยอที่บรรจุอยู่ในถุงพลาสติกในกระบอกโลหะจากข้อ 1.1.1 มาติดตั้งหัววัดอุณหภูมิ (thermocouple) เพื่อตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิภายในแท่งหมูยอ ซึ่งทำได้โดยการเสียบหัววัดอุณหภูมิเข้าทางบริเวณด้านบนของแท่งหมูยอ กะระยะให้ปลายของหัววัดอุณหภูมิอยู่ตรงกึ่งกลางของแท่งหมูยอ ส่วนหัววัดอุณหภูมิอีกอันถูกนำไปวางในหม้อต้มไฟฟ้าเพื่อวัดอุณหภูมิของน้ำ ภาพแสดงในภาคผนวก ข

1.1.3 การหาระยะเวลาที่ใช้ในการต้มหมูยอ

นำกระบอกโลหะที่มีหมูยอซึ่งติดตั้งหัววัดอุณหภูมิแล้ว วางในหม้อต้มไฟฟ้าเมื่ออุณหภูมิน้ำร้อนประมาณ 75 องศาเซลเซียส แล้วทำการบันทึกอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไปของน้ำร้อนและอุณหภูมิตรงจุดกึ่งกลางของแท่งหมูยอในระหว่างการต้มทุกๆ 1 นาที จนกระทั่งอุณหภูมิตรงจุดกึ่งกลางของแท่งหมูยอเป็น 72 $\pm$ 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที บันทึกเวลาที่ใช้ในการต้ม ภาพแสดงในภาคผนวก ข

1.1.4 การลดอุณหภูมิหมูยอ

นำกระบอกโลหะที่มีหมูยอซึ่งผ่านการต้มแล้วจากข้อ 1.1.3 มาทำให้เย็นตัวลงโดยการแช่ในน้ำเย็นที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ตามวิธีของกรมปศุสัตว์ (2536) ในขั้นตอนที่ 4 ภาพดังแสดงในภาคผนวก ข

1.1.5 การเก็บรักษาตัวอย่างหมูยอ

นำตัวอย่างหมูยอมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยใช้ตู้บ่มเชื้อแบบธรรมดา

1.1.6 การสุ่มตัวอย่างหมูยอ

ทำการสุ่มตัวอย่างหมูยอจากข้อ 1.1.5 จำนวน 4 ตัวอย่าง เพื่อนำมาวิเคราะห์

1.1.6.1 ประเมินลักษณะทางกายภาพด้านสี เนื้อสัมผัส และกลิ่น เมื่อเก็บรักษาที่ 0 และ 2 วัน

1.1.6.2 จุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรค และดัชนีของเชื้อโรค ดังนี้ *Staphylococcus aureus*, *Salmonella, Clostridium perfringens,* Coliform bacteria และ *Escherichia coli* เมื่อเก็บรักษาที่ 0 วัน

1.1.6.3 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด เมื่อเก็บรักษาที่ 0 และ 2 วัน

แผนภูมิแสดงการทดลอง ดังภาพผนวกที่ ค-1

1.2 การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการต้ม

ทำการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการต้มหมูยอ ซึ่งจะมีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์เริ่มต้นลงได้ในระดับหนึ่ง ทั้งนี้เพื่อให้อายุการเก็บรักษายาวนานขึ้น การทดลองจะกระทำโดยการผันแปรระยะเวลาที่ใช้ในการต้มให้นานขึ้นกว่าเดิม โดยอาศัยข้อมูลที่ได้รับจากข้อ 1.1 ที่ใช้เวลาในการต้มนาน 33 นาที เพื่อให้อุณหภูมิตรงจุดกึ่งกลางของแท่งหมูยอเป็น 72 $\pm$ 0.5 องศาเซลเซียส ระดับละ 15 นาที จำนวน 3 ระดับ คือ 48 63 และ 78 นาที หรือเป็นระยะเวลาที่อุณหภูมิตรงจุดกึ่งกลางของแท่งหมูยอเป็น 72 $\pm$ 0.5 องศาเซลเซียส นาน 15 30 และ 45 นาที ตามลำดับ ซึ่งมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

1.2.1 การเตรียมตัวอย่างหมูยอ

กระทำเช่นเดียวกันกับข้อ 1.1.1

1.2.2 การต้มหมูยอ

นำกระบอกโลหะที่มีหมูยอจากข้อ 1.2.1 มาต้มในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ผันแปรระยะเวลาที่ใช้ในการต้มเป็น 3 ระดับคือ ต้มนาน 48 63 และ 78 นาที ตามลำดับ

1.2.3 การลดอุณหภูมิหมูยอ

กระทำเช่นเดียวกันกับข้อ 1.1.4

1.2.4 การเก็บรักษาตัวอย่างหมูยอ

กระทำเช่นเดียวกันกับข้อ 1.1.5

1.2.5 การสุ่มตัวอย่างหมูยอ

ทำการสุ่มตัวอย่างหมูยอจากข้อ 1.2.4 จำนวนชุดละ 4 ตัวอย่าง เพื่อนำมาวิเคราะห์

1.2.5.1 ประเมินลักษณะทางกายภาพด้านสี เนื้อสัมผัส และกลิ่น เมื่อเก็บรักษาที่ 0 1 2 และ 3 วัน

1.2.5.2 จุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรค และดัชนีของเชื้อโรค ดังนี้ *Staphylococcus aureus*, *Salmonella, Clostridium perfringens,* Coliform bacteria และ *Escherichia coli* เมื่อเก็บรักษาที่ 0 วัน

1.2.5.3 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด เมื่อเก็บรักษาที่ 0 1 2 และ 3 วัน

1.2.6 การเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมในการต้มหมูยอ

เลือกระยะเวลาต้มหมูยอ ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพด้านจุลินทรีย์อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ลักษณะกายภาพดี และมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนาน เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

แผนภูมิแสดงการทดลอง ดังภาพผนวกที่ ค-2

2. การศึกษาผลของการเติมโซเดียมเบนโซเอตต่อคุณลักษณะของหมูยอ

การศึกษาผลการเติมโซเดียมเบนโซเอตต่อคุณลักษณะของหมูยอ โดยทำการประเมินทางประสาทสัมผัส ด้านสี เนื้อสัมผัส และรส ซึ่งมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

2.1 การเตรียมตัวอย่างหมูยอ

ทำการผลิตหมูยอโดยใช้สูตรดัดแปลงจากกรมปศุสัตว์ (2536) และผลิตตามวิธีของกรมปศุสัตว์ (2536) ในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ การสับผสม และบรรจุหมูยอลงในถุงพลาสติกที่วางอยู่ในกระบอกโลหะ ดังแสดงในภาคผนวก ก การผลิตหมูยอในขั้นตอนที่ 1 และ 2 โดยเนื้อหมูที่ใช้ในการศึกษา จะถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิไม่เกิน 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 48 ชั่วโมง ในขั้นตอนสับนวดเนื้อจะมีการเติมโซเดียมเบนโซเอตพร้อมกับเครื่องปรุงต่างๆ โดยจะทำการผันแปรปริมาณโซเดียมเบนโซเอตเป็น 5 ระดับ คือ 0 (ควบคุม) 500 1,000 1,500 และ 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แล้วนำหมูยอไปต้มในน้ำร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 75 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาในการต้มหมูยอนาน 53 นาที และนำหมูยอที่ต้มแล้วมาทำให้เย็น

2.2 การประเมินทางประสาทสัมผัส

นำหมูยอจากข้อ 2.1 มาประเมินทางประสาทสัมผัส ด้านสี เนื้อสัมผัส และรส

แผนภูมิแสดงการทดลอง ดังภาพผนวกที่ ค-3

3. การศึกษาผลของการเติมโซเดียมเบนโซเอตต่ออายุการเก็บรักษาของหมูยอ

ทำการศึกษาผลของการเติมโซเดียมเบนโซเอต ต่อคุณภาพการเก็บรักษาของหมูยอที่อุณหภูมิ 32 และ 4 องศาเซลเซียส ดังนี้

3.1 การศึกษาผลของการเติมโซเดียมเบนโซเอต ต่ออายุการเก็บรักษาหมูยอที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส มีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

3.1.1 การเตรียมตัวอย่างหมูยอ

กระทำเช่นเดียวกับการศึกษาข้อ 2.1

3.1.2 การเก็บรักษาตัวอย่างหมูยอ

นำตัวอย่างหมูยอมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยใช้ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบธรรมดา

3.1.3 การสุ่มตัวอย่างหมูยอ

ทำการสุ่มตัวอย่างหมูยอจากข้อ 3.1.2 ที่มีโซเดียมเบนโซเอตปริมาณแตกต่างกันปริมาณละ 4 ตัวอย่าง เพื่อนำมาวิเคราะห์

3.1.3.1 ปริมาณโซเดียมเบนโซเอต เมื่อเก็บรักษาที่ 0 วัน

3.1.3.2 ประเมินลักษณะทางกายภาพ เมื่อเก็บรักษาที่ 0 1 2 และ 3 วัน

3.1.3.3 ค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อเก็บรักษาที่ 0 1 2 และ 3 วัน

3.1.3.4 จุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรค และดัชนีของเชื้อโรค ดังนี้ *S. aureus, Salmonella, C. perfringens*, Coliform bacteria และ *E. coli* เมื่อเก็บรักษาที่ 0 วัน

3.1.3.5 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด เมื่อเก็บรักษาที่ 0 1 2 และ 3 วัน

แผนภูมิแสดงการทดลอง ดังภาพผนวกที่ ค-3

3.2 การศึกษาผลของการเติมโซเดียมเบนโซเอตต่อคุณภาพการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

3.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

กระทำเช่นเดียวกับการศึกษาข้อ 2.1

3.2.2 การเก็บรักษาตัวอย่างหมูยอ

นำตัวอย่างหมูยอมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้ตู้เย็น

3.2.3 การสุ่มตัวอย่างหมูยอ

ทำการสุ่มตัวอย่างหมูยอจากข้อ 3.2.2 ที่มีโซเดียมเบนโซเอตปริมาณแตกต่างกันปริมาณละ 4 ตัวอย่าง เพื่อทำการวิเคราะห์

3.2.3.1 ปริมาณโซเดียมเบนโซเอต เมื่อเก็บรักษาที่ 0 วัน

3.2.3.2 ประเมินลักษณะทางกายภาพ เมื่อเก็บรักษาที่ 0 2 4 6 8 14 20 26 32 38 44 50 56 และ 62 วัน

3.2.3.3 ค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อเก็บรักษาที่ 0 2 4 6 8 14 20 26 32 38 44 50 56 และ 62 วัน

3.2.3.4 จุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรค และดัชนีของเชื้อโรค ดังนี้ *S. aureus, Salmonella, C. perfringens*, Coliform bacteria และ *E. coli* เมื่อเก็บรักษาที่ 0 วัน

3.2.3.5 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด เมื่อเก็บรักษาที่ 0 2 4 6 8 14 20 26 32 38 44 50 56 และ 62 วัน

แผนภูมิแสดงการทดลอง ดังภาพผนวกที่ ค-3

วิธีการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ประกอบด้วย 4 คุณลักษณะ คือ ด้านประสาทสัมผัส ด้านเคมี ด้านกายภาพ และด้านจุลชีววิทยา ดังนี้

1. การประเมินด้านประสาทสัมผัส

โดยการให้คะแนนในด้านสี ลักษณะเนื้อ และรส ซึ่งดัดแปลงแบบฟอร์มการให้คะแนนจากมาตรฐานของผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมหมูยอ (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2539) ซึ่งใช้ผู้ทดสอบจำนวน 20 คนที่ไม่ได้รับการฝึกฝน ดังแสดงในภาคผนวก ง และนำมาทดสอบความแตกต่างของคะแนนทางประสาทสัมผัส ด้านสี ลักษณะเนื้อ และรส ของหมูยอที่เติมโซเดียมเบนโซเอตปริมาณต่างๆ โดยใช้การทดสอบที่ไม่ใช่พารามิเตอร์แบบ K Independent Sample (Kruskal Wallis H Test) (Gardiner, 1997)

2. การวิเคราะห์ด้านเคมี

การวิเคราะห์ทางเคมีมี 2 ส่วนคือปริมาณโซเดียมเบนโซเอตในตัวอย่าง และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ดังแสดงในภาคผนวก จ

2.1 ปริมาณโซเดียมเบนโซเอตในตัวอย่าง (คำนวณในรูปกรดเบนโซอิก) (AOAC, 1990; Kamlert, 1992)

2.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (Gill and Holley, 2000)

3. การประเมินด้านกายภาพ

การประเมินด้านกายภาพ โดยการใช้สายตา การดมกลิ่น และการใช้นิ้วมือกดและบีบแท่งหมูยอ ซึ่งทดสอบกับแท่งหมูยอและชิ้นหมูยอที่หั่นแล้ว

4. การวิเคราะห์ด้านจุลชีววิทยา

การวิเคราะห์ด้านจุลชีววิทยา ประกอบด้วยการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรคและดัชนีของเชื้อโรคได้แก่ *Staphylococcus aureus, Salmonella, Clostridium perfringens*, Coliform bacteria และ *Escherichia coli* และปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ดังแสดงในภาคผนวก ฉ

4.1 *Staphylococcus aureus* (FDA ,1984)

4.2 *Salmonella* (AOAC, 1996) ข้อ 17.9.01 - 17.9.03 และข้อ 17.9.07

4.3 *Clostridium perfringens* (FDA, 1992)

4.4 Coliform bacteria และ *Escherichia coli* โดยวิธีเอ็ม พี เอ็น (Most Probable Number) (AOAC, 1996) ข้อ 17.2.02

4.5 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Elliott และคณะ , 1982)