บทที่3

การดำเนินงานวิจัย

สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี

สารละลายเอทานอลความเข้มข้น 95% และ 99.5% (A.R. grade)

สารละลาย Folin-Ciocalteau reagent (Merck, Germany)

สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 20% (w/v) (A.R. grade)

สารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Fluka, Germany)

สารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 2% (v/v) (A.R. grade)

สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 4 M(A.R. grade)

สารละลาย Thiobarbituric acid (TBA) 0.2883 กรัม (g) ใน glacial acetic acid 90 % (A.R. grade)

วัตถุดิบ

ชาเขียวที่ใช้ในการทดลองเป็นชาเขียวญี่ปุ่น (Japanese green tea) ชนิด Sen cha (Shincha Ohashiri, KK Yamadaen, Japan) วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก เช่น EGCG, EGC, EC, ECG, Catechin, Rutin, Quercetin, Gallic acid และ Kaempferol ของชาเขียวที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้โดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ผลการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ข.1

ไคโตซานที่มีค่า degree of deacetylation 95% น้ำหนักโมเลกุล 100,000 daltons (Seafresh Chitosan Co., Ltd.,Bangkok, Thailand)

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

Staphylococcus aureus TISTR 118

จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

Escherichia coli TISTR 780

จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

Pseudomonas fluorescens TISTR 358

จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

Salmonella Enteritidis DMST 17368
จากศูนย์เก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์แห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมสารสกัดชาเขียว

3.1.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดชาเขียวต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมสารสกัดชาเขียว โดยแปรระดับของอุณหภูมิ เป็น 50, 60 และ 70 °C และระยะเวลาเป็น 10, 20 และ 30 นาที เตรียมโดยนำชาเขียว (*Camellia sinensis*) มาปั่นให้เป็นผงแล้วชั่งชาเขียวชั่งด้วยเครื่องชั่ง(E5500-S, Sartorius, Sartorius Mechatronics, Gottingen, Germany) ปริมาณ 2 g ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำร้อนปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ml) ตามอุณหภูมิและเวลาที่กำหนด แล้วนำไปเขย่าใน water bath shaker (SW23, Julabo,JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach, Germany) โดยใช้ความเร็วในการเขย่า 130 rpm กรองผงชาออกด้วยผ้าขาวบาง และนำสารสกัดไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (Kubota 5310, Kubota corporation, Osaka, Japan) ด้วยความเร็ว 4000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนชาออก กรองสารสกัดอีกครั้งโดยใช้กระดาษกรองWhatman No. 1 ได้สารสกัดชาเขียว

จากนั้นหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteau โดยดัดแปลงจากวิธีของ Choi และคณะ (2006) โดยปิเปตสารสกัดชาเขียว ปริมาตร 0.1 ml ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำ 7 ml แล้วตามด้วย Folin-Ciocalteau reagent ปริมาตร 0.5 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 8 นาที เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 20% (w/v) ปริมาตร 1.5 ml เติมน้ำกลั่นปริมาตร 0.9 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex (VX100, Labnet, Labnet International Inc., Woodbridge, USA) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง (ห้ามสัมผัสแสง) วัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วย UV-spectrophotometer (GENESYS 20, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) และคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แสดงหน่วยเป็น mg gallic acid equivalent/g sample (mg GAE/g)

ออกแบบการทดลองแบบ Symmetric Factorial Experiment with Completely Randomized Design (CRD) ขนาด 3×3 ทดลอง 2 ซ้ำวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของข้อมูล และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DNMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (version 17, USA)

3.1.2 การศึกษาผลของอัตราส่วนของชาเขียวต่อตัวทำละลาย

เตรียมสารสกัดชาเขียวที่มีความเข้มข้นของชาเขียวที่ระดับต่างๆ โดยนำชาเขียวมาปั่นให้เป็นผงแล้วชั่งชาเขียวจำนวน 2, 5, 10 และ 20 g ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำร้อนปริมาตร 100 ml โดยใช้อุณหภูมิและเวลาตามภาวะที่เหมาะสม ที่ได้จากการทดลองที่ 3.1.1 จากนั้นนำไปเขย่าใน water bath shaker โดยใช้ความเร็วในการเขย่า 130 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองผงชาออกด้วยผ้าขาวบาง และนำสารสกัดไปปั่นเหวี่ยง โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 4000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตะกอนชา กรองสารสกัดอีกครั้งโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No. 1 นำสารสกัดชาเขียวที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด, สมบัติการต้านอนุมูล DPPH และสมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดังต่อไปนี้

3.1.2.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ทำโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteau ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Choi และคณะ (2006) ทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 3.1.1

3.1.2.2 สมบัติการต้านอนุมูล DPPH

การวัดสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ใช้วิธี DPPH radical scavenging ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Brand-Williams, Cuvelier และ Berset (1995) โดย ปิเปตสารสกัดจากข้อ 3.1.1 ปริมาตร 3 ml ลงในหลอดทดลอง จากนั้นปิเปตสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ในเอทานอล 99.5% (v/v) ความเข้มข้น 0.5 mM ปริมาตร 3 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที (ห้ามสัมผัสแสง) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer ใช้น้ำกลั่นเป็น blank แล้วคำนวณ DPPH radical scavenging activity (%) จากสมการที่ 1

$$= \frac{\text{Absorbance of control - Absorbance of sample} \times 100}{\text{Absorbance of control}} \quad (1)$$

3.1.2.3 สมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

การศึกษาผลของการแปรปริมาณความเข้มข้นของชาเขียวที่ระดับต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี agar diffusion โดยดัดแปลงจากวิธีของ Pranoto, Rakshit และ Salokhe (2005) ในการทดลองใช้จุลินทรีย์ชนิดแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* TISTR 118 และจุลินทรีย์ชนิดแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* TISTR 780, *P. fluorescens* TISTR 358 และ S. Enteritidis DMST 17368 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน Nutrient agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Bombay, India) ที่มีปริมาณจุลินทรีย์ 10^6-10^7 CFU/ml ซึ่งเตรียมโดยเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน Nutrient broth (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Bombay, India) และปมที่อุณหภูมิ 37 °C เพื่อให้มีปริมาณจุลินทรีย์อยู่ในช่วง 10^7 CFU/ml โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเป็น 0.40 แล้วใช้ปริมาตร 0.1 ml spread plate ให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานที่เตรียมไว้ ปิเปตสารสกัดชาเขียวที่มีความเข้มข้นของชาเขียว 2, 5, 10 และ 20 % (w/v) ปริมาตร 0.1 ml ลงบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ (paper discs) เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (mm) แล้ววางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานที่มีจุลินทรีย์ตามที่กำหนดแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้น *P. fluorescens* ใช้อุณหภูมิ 30 ^{0}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบบริเวณยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (inhibiton zone) โดยวัดผ่านเส้นผ่านศูนย์กลางของ paper discs และตรวจบริเวณผิวสัมผัส (contact surface) ใช้สำหรับทดสอบบริเวณที่สารสกัดสัมผัสโดยตรงกับจุลินทรีย์

3.1.3 การออกแบบการทดลองและการวิเคราะห์สถิติ

การทดลองที่ 3.1.2 ออกแบบการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของข้อมูล และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DNMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (version 17, USA)

3.2 การศึกษาผลของการเติมสารสกัดจากชาเขียวต่อสมบัติของฟิล์มไคโตซาน

เตรียมสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 2% (w/v) โดยชั่งไคโตซาน (Seafresh Chitosan Co., Ltd.,Bangkok, Thailand) ที่มีค่า degree of deacetylation 95% น้ำหนักโมเลกุล 100,000 daltons ปริมาณ 4 g แล้วเติมน้ำกลั่น 50 ml ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เติมสารละลาย acetic acid ความเข้มข้น 2 % (v/v) 100 ml คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (Steromag, Steroglass, Steroglass S.r.l., Perugia, Italy) 15 นาที นำไปเขย่าใน water bath shaker ที่อุณหภูมิ 60 °C

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมกลีเซอรอล 1.2 g เติมสารสกัดที่มีความเข้มข้น 2, 5, 10 และ 20% (w/v) ลงในสารละลายฟิล์มโดยเติมเป็นปริมาตร 25% (v/v) ของสารละลายฟิล์ม ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง homogenizer (D-79282, Ystral GmbH, Ballrechten-Dottingen, Germany) ด้วย หัวเบอร์ 18/G ใช้ความเร็ว 19000 rpm เป็นเวลา 1.5 นาที ไล่ฟองอากาศด้วยเครื่อง Sonicator (136H, Ultrasonik™, Fisher Scientific, Waltham, USA) เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายฟิล์มประมาณ 95 ±1 g ใส่พิมพ์เซรามิกขนาด 12 x 28 cm เก็บฟิล์มในตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ (RH) (Patron, GH-10, Taipei, Taiwan) ที่อุณหภูมิ 27 °C และ RH 50±5% วัดคุณสมบัติของฟิล์มดังต่อไปนี้

3.2.1 สมบัติทางกายภาพ

3.2.1.1 ความหนา

วัดความหนาของแผ่นฟิล์มที่ตัดให้มีขนาด 3×15 cm ด้วยเครื่อง micrometer (Dial Thinckness Gauge 7301, Mitutoyo Co.,Ltd., Kanagawa, Japan) วัด 6 จุดต่อ 1 แผ่น เป็นจำนวน 4 แผ่นแล้วนำมาคิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1 ซ้ำ ทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.1.2 ค่าทางสี (L a* b*)

วัดค่าทางสีโดยใช้ระบบ CIELAB ได้แก่ค่า L* value (lightness) a* value (redness) และ b* value (yellowness) โดยตัดฟิล์มเป็นแผ่นสี่เหลี่ยมขนาด 15 x 2.5 cm วัดสีฟิล์มโดยใช้เครื่อง chroma meter (Minolta CR-300 Series, Minolta, Osaka, Japan) วัด 6 จุดต่อ 1 แผ่น เป็นจำนวน 4 แผ่น แล้วนำมาคิดค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1 ซ้ำ ทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.1.3 ค่าการซึมผ่านของไอน้ำ (Water vapor permeability, WVP)

วัด WVP (g.mm/Pa.day.m^2) โดยดัดแปลงจากวิธี ASTM (1980) ทำโดยชั่ง silica gel ปริมาณ 20 g ใส่ลงขวดแก้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 cm และมีปริมาตร 50 ml ตัดฟิล์มให้มีขนาด 6 x 6 cm หุ้มฟิล์มบริเวณปากขวดแล้วขึงฟิล์มให้ตึงด้วยพาราฟิล์ม ชั่งน้ำหนักขวดที่ติดฟิล์มแล้ว ก่อนนำไปเก็บไว้ในเดซิเคเตอร์ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ RH 100% ที่ 30 °C ชั่งจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ จากนั้นคำนวณหาค่า WVP โดยใช้สมการที่ (2)

$$WVP = \frac{(w \bullet x)}{A \bullet t \bullet (P_2 - P_1)} \qquad (2)$$

w คือน้ำหนักฟิล์มที่เพิ่มขึ้น (g), x คือ ความหนาของฟิล์มที่ใช้ในการทดลอง (mm), A คือ พื้นที่หน้าตัดของแผ่นฟิล์ม (m^2), t คือระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง (ชั่วโมง), $P_2 - P_1$ คือผลต่างของค่าความดันไอน้ำภายนอกและภายในของขวดแก้ว (Pa)

3.2.2 สมบัติทางเคมี

วัดคุณสมบัติทางเคมีของฟิล์มไคโตซานโดยวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสมบัติการต้านอนุมูล DPPH ดังนี้

3.2.2.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากฟิล์ม โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteau ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Choi และคณะ (2006) โดยทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 3.1.1

3.2.2.2 สมบัติการต้านอนุมูล DPPH

การศึกษาปฏิกิริยาการจับอนุมูล DPPH จากสารละลายฟิล์ม ใช้วิธี DPPH radical scavenging โดยดัดแปลงจากวิธีของ Brand-Williams, Cuvelier และ Berset (1995) โดยทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 3.1.2.2

3.2.3 สมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

การศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ 4 ชนิด คือ *S. aureus*, S. Enteritidis, *E. coli* และ *P. fluorescens* ใช้วิธี agar diffusion ดัดแปลงจากวิธีของ Hamilton-Miller (1995) โดยตัดฟิล์มไคโตซานที่เติมและไม่เติมสารสกัดชาเขียวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm แทนการใช้ paper discs โดยทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 3.1.2.3

3.2.4 การออกแบบการทดลองและการวิเคราะห์สถิติ

ออกแบบการทดลองแบบ CRD ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของข้อมูล และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DNMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (version 17, USA)

3.3. การศึกษาการใช้ฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดชาเขียวในการยืดอายุผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมู

นำฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดชาเขียวที่ได้จากภาวะที่เหมาะสมในการทดลองที่ 3.1 และ 3.2 เก็บฟิล์มในตู้ RH ที่ 27 ^{0}C ที่มี RH 50 ± 5% นาน 24 ชั่วโมง แล้วตัดฟิล์มเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 11.5×8.5 cm จากนั้นนำมาห่อไส้กรอกคอกเทลหมู (บริษัทซีพีเอฟ ผลิตภัณฑ์อาหารจำกัด, ประเทศไทย) และใช้เอ็นมัดบริเวณหัวและท้ายของไส้กรอกให้แน่นโดยทดลองในตู้ ปลอดเชื้อ (laminar flow) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแสง ultraviolet (UV) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บรรจุผลิตภัณฑ์ ลงในถุง nylon LLDPLE-laminated Nylon ที่มีความหนา = 0.0838 mm, อัตราการซึมผ่านของ ไอน้ำ (water vapor transmission rate , WVTR)= 57g.m^{-2}day^{-1} อัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน (oxygen transmission rate, OTR) = 25 cc. m^{-2}day^{-1} ปิดผนึกด้วยความร้อนโดยใช้ heat sealer และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C วิเคราะห์คุณภาพด้านต่างๆ ทุกๆ 4 วัน ตลอดอายุการเก็บรักษาโดยแกะฟิล์มออกจากผลิตภัณฑ์ไส้กรอกในตู้ปลอดเชื้อก่อนการวิเคราะห์คุณภาพทางด้านต่างๆ ทั้งนี้อุปกรณ์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการห่อผลิตภัณฑ์ไส้กรอกได้ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย UV เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนทุกครั้ง (Taniwaki และคณะ, 2001)

3.3.1. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมู

3.3.1.1 ค่าทางสี

วัดค่าทางสีด้วยเครื่อง chroma meter ระบบ CIELAB และบันทึกค่า L* value (lightness) a* value (redness) และ b* value (yellowness) โดยวัดผลิตภัณฑ์ไส้กรอก 6 จุดต่อ 1 ชิ้น เป็นจำนวน 3 ชิ้น แล้วนำมาคิดเป็นค่าเฉลี่ยต่อ 1 ซ้ำ ทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.1.2 ลักษณะเนื้อสัมผัส

วัดค่าแรงตัดขาด (cutting force) โดยใช้เครื่อง Texture Analyzer (Lloyd Food Texture Analyzer, model TA 500, England) โดยนำไส้กรอก วางตามแนวนอน ตั้งโปรแกรมการวัดดังต่อไปนี้ (รายงานผลเป็นค่า gram force)

Test mode and option

Warner-Bratzler Blade(HDP/BS

Force in Compression

Return to start

Parameter

Pre-Test Speed	2.0	mm/s
Test Speed	2.0	mm/s
Post-Test Speed	10.0	mm/s
Distance	30	mm

Trigger

Type	Auto
Force	20 g

Data Acquistion Rate 200 pps

3.3.2 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมู

3.3.2.1 ค่า pH

วัดค่า pH. ตามวิธีของ Summo, Caponio และ Pasqualone (2006) โดยปั่นตัวอย่างไส้กรอก 10 g ด้วยเครื่อง stomacher (Seward stomacher รุ่น 400, England) ในน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วน 1/10 (sample/water) นำไปวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter (Inolab รุ่น TetraCon 325, StirrOx G, TA197Oxi, Weilheim, Germany)

3.3.2.2 ค่า TBA

ติดตามการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของผลิตภัณฑ์ไส้กรอก โดยวิเคราะห์ค่า TBA ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Pikul, Leszezynski and Kummerow (1989) โดยนำไส้กรอก 10 g ปั่นรวมกับน้ำกลั่น 50 ml ถ่ายใส่ขวดกลั่น เติมน้ำกลั่น 47.5 ml และ HCl ความเข้มข้น 4 M 2.5 ml (เพื่อปรับ pH ให้เป็น 1.5) กลั่นตัวอย่างแล้วนำสารละลายที่กลั่นได้ 5 ml เติมด้วย TBA reagent 5 ml แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ต้มในน้ำเดือดนาน 35 นาที และทำให้เย็นทันที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 nm ด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่างเป็น blank คำนวณค่า TBA value จากสมการที่ 3

TBA value (mg malonaldehyde/Kg sample) = 7.8× D (3)

โดย D = ค่า Absorbance ของตัวอย่าง

3.3.3. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมู

วิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ยีสต์ รา และแบคทีเรียแลกติก โดยดัดแปลงจาก วิธีของ Bingol และ Bostan (2007) สำหรับแบคทีเรียทั้งหมด ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Bombay, India) ยีสต์ ราใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Bombay, India) ที่ผ่านการปรับ pH ด้วยกรดทาร์ทาริก (tartaric acid) 10% และแบคทีเรียแลกติกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Lactobacillus MRS Agar (MRS) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Bombay, India) ชั่งตัวอย่าง 10 g ลงในสารละลาย peptone 0.1 % ปริมาตร 90 ml นำถุงตัวอย่างเข้าเครื่องตีตัวอย่าง stomacher (Seward stomacher รุ่น 400, England) จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจาง ปริมาตร 0.1 ml ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ PDA โดยใช้วิธี spread plate และปริมาตร 1 ml สำหรับ MRS โดยใช้วิธี pour plate จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับ PCA ส่วน PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25-30 ^{0}C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง และแบคทีเรียแลกติก บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจนใน anaerobic jar ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์ ราและ แบคทีเรียแลกติก ทุกๆ 4 วันตลอดอายุการเก็บรักษา โดยนับจำนวนโคโลนีระหว่าง 20-200 โคโลนี รายงานผลเป็นโคโลนีต่อกรัมตัวอย่าง (CFU/g)

3.3.4. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมู

ทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมู ใช้วิธีทดสอบเชิงพรรณา ใช้สเกลเส้นตรงระดับความเข้ม 0-10 (Descriptive analysis with scaling) ทดสอบโดยใช้ผลิตภัณฑ์ไส้กรอก จำนวน 1 ชิ้นต่อ 1 ตัวอย่าง ให้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝนจำนวน 10 คน อายุเฉลี่ย 20-30 ปี เพศชายและเพศหญิงของภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พิจารณาจากสี, การเกิดเมือก, กลิ่นผิดปรกติ และการยอมรับโดยรวม โดยมาตรฐานระดับของสีที่ใช้ อ้างอิงมาจาก The Munsell Book of Color (The Munsell Book of Color, 2.5R-10G, Munsell^{R}color service, New York, USA)

จากการประชุมร่วมกันของผู้ทดสอบ ในการเลือกระดับสีของไส้กรอกซึ่งสรุปและได้ข้อตกลงร่วมกันคือ ไส้กรอกเริ่มต้น (วันที่ 0) มีสีชมพู (Hue= 10 R และ Value/chroma= 6/6) ซึ่งจัดให้อยู่ในระดับคะแนนเท่ากับ 5 จากนั้นความอ่อนและความเข้มของสี ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก

จะเพิ่มขึ้นหรือลดลง ขึ้นอยู่กับระยะเวลาการเก็บรักษาที่เปลี่ยนแปลง (วันที่ 4, 8, 12, 16 และ 20) ส่วนการเกิดเมือกและกลิ่นผิดปรกตินั้น มีเกณฑ์ในการพิจารณาคะแนนการเสื่อมเสียของไส้กรอกที่ถูกคัดออก คือ การเกิดเมือกที่มีระดับคะแนน เท่ากับ 1 และกลิ่นผิดปรกติที่มี ระดับคะแนนเท่ากับ 5 ทั้งนี้ได้ให้ผู้ทดสอบเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของไส้กรอกในด้านต่างๆ ตามระดับคะแนน ดังนี้

ระดับสีของไส้กรอก (ระดับคะแนน 0 หมายถึง สีผิดปรกติ)
(ระดับคะแนน 5 หมายถึง สีชมพู)
(ระดับคะแนน 10 หมายถึง สีชมพูเข้ม)

การเกิดเมือก (ระดับคะแนน 0 หมายถึง ไม่มีการเปลี่ยนแปลง)
(ระดับคะแนน 5 หมายถึง มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย)
(ระดับคะแนน 10 หมายถึง มีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด)

กลิ่นผิดปรกติ (ระดับคะแนน 0 หมายถึง ไม่มีกลิ่นผิดปรกติ)
(ระดับคะแนน 5 หมายถึง เริ่มมีกลิ่นผิดปรกติเล็กน้อย)
(ระดับคะแนน 10 หมายถึง มีกลิ่นผิดปรกติมากที่สุด)

3.3.5 การออกแบบการทดลองและการวิเคราะห์สถิติ

การทดลองที่ 3.3.1-3.3.3 ออกแบบการทดลองแบบ Symmetric Factorial Experiment with Completelyly Randomized Design (CRD) ขนาด 3×6 ทดลอง 3 ซ้ำวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของข้อมูล และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DNMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (version 17, USA)

การทดลองที่ 3.3.4 ออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล 4x3 ในแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (4x3 Factorial in RCBD) ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DNMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (version 17, USA) ตัวอย่างแบบทดสอบทางประสาทสัมผัสแสดงในภาคผนวก ก