

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### วัตถุดิบที่ใช้ในการทำวิจัย

วัตถุดิบที่ใช้ในการทำปลาช่อนแดดเดียว

1. ปลาช่อน ใช้ปลาช่อนสด ที่ได้จากตลาดสถานีรถไฟ จังหวัดพิษณุโลก โดยใช้ปลาขนาด 700-800 กรัม ต่อตัว
2. น้ำตาลทรายขาว ตรามิตรผล
3. เกลือแกง ตราปฐกทิพย์
4. กรดอะซิติก จากบริษัทวิทยาศาสตร์ (Food grade)
5. กรดซิตริก จากบริษัทวิทยาศาสตร์ (Food grade)
6. กรดแลคติก จากบริษัทวิทยาศาสตร์ (Food grade)

#### สารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัย

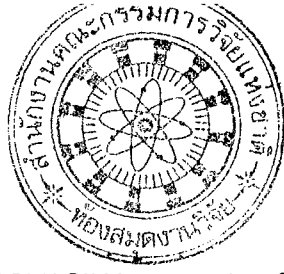
1. กรดไทโอบาร์บิทูริก (thiobarbituric acid : TBA)
2. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (HCl) 4 N
3. กรดกลีเซอริกแอซิติก (glacial acetic acid :  $\text{CH}_3\text{COOH}$ )
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 N
5. ฟีนอล์ฟทาลีน (phenolphthalein :  $\text{C}_2\text{OH}_{14}\text{O}_4$ )
6. โพแทสเซียมซัลเฟต (potassium sulfate :  $\text{K}_2\text{SO}_4$ )
7. กรดซัลฟูริก (sulfuric acid :  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
8. กรดบอริก (boric acid :  $\text{H}_3\text{BO}_3$ )
9. เมทิลเรด (methyl red :  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ )
10. ปีโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether)
11. คลอโรฟอร์ม (chloroform :  $\text{CHCl}_3$ )
12. โพแทสเซียมไอโอไดด์ (potassium iodide : KI)
13. โซเดียมไทโอซัลเฟต (sodium thiosulfate :  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )
14. น้ำแป้ง (starch)

### อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทำวิจัย

1. PCA (Plate count agar)
2. 0.1 % peptone water
3. Laurly Sulfate Tryptose broth (LSTB)
4. Rose Bengal agar
5. MRS agar
6. Mannitol Salt Phenol-red agar

### อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการผลิตปลาช่อนแดดเดียว
  - 1.1 ถุงพลาสติกชนิด LDPE แบบ ziplock ขนาด 10 × 10 นิ้ว
  - 1.2 ตู้อบลมร้อนแบบถาด (tray dryer: model KPO-700)
2. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมี
  - 2.1 เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Mettler toledo: model PE 503-s)
  - 2.2 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler toledo: model AC 2105)
  - 2.3 ตู้อบลมร้อน (hot air oven: model 5300)
  - 2.4 เดซิเคเตอร์ดูดความชื้น (desicater)
  - 2.5 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV/VIS spectrophotometer) (Perkin elmer: model lambda 20)
  - 2.6 เครื่องบดอาหาร (blender) (National: model MX-795 N)
  - 2.7 เครื่องหาความชื้นอัตโนมัติ (Sartorius: model MA 40)
  - 2.8 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pHmeter) (ATIORION, The Scharfft Center,U.S.A.)
  - 2.9 ชุดอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์โปรตีน (Buchi: B-323 S/N 1259061)
  - 2.10 ชุดอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ไขมัน (Buchi: B-810 S/N 0996182)
  - 2.11 ชุดอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์เถ้า (Fisher: S/N 60200010)
  - 2.12 ชุดอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ Thiobarbituric acid (TBA)
  - 2.13 ชุดอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ Peroxide value (PV)
3. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางกายภาพ
  - 3.1 เครื่องวัดค่าสี (Hunter lab: model DP 9000 S/N 90905)



- 3.2 เครื่องมือวิเคราะห์  $a_w$  (NOVASINA:  $a_w$  center 200 S/N)
4. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์
  - 4.1 เครื่องแก้วใช้ในการวิเคราะห์
  - 4.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (model KT-30L, ALP Co.LTD, Tokyo Japan)
  - 4.3 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Shel lab, model 2020, Shaldon Manufacturing Inc., U.S.A.)
  - 4.4 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Polyscience, 8205, Pleasant Prairie, U.S.A)
  - 4.5 เครื่องตีผสมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ (Seward, model 400 Ba 7021, UK)
5. อุปกรณ์และเครื่องมือในการทดสอบทางประสาทสัมผัส
  - 5.1 ถ้วยพลาสติกสำหรับใส่ตัวอย่าง
  - 5.2 ถาดพลาสติกสำหรับใส่ตัวอย่าง
  - 5.3 แก้วน้ำดื่ม
  - 5.4 กระดาษทิชชู
  - 5.5 ดินสอ
  - 5.6 แบบรายงานผลการทดสอบ

### ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

การเตรียมตัวอย่างปลาช่อนแดดเดียว ใช้ปลาช่อนสด ขนาด 700-800 กรัม ต่อ 1 ตัว โดยใช้อัตราส่วนระหว่างปลา : เกลือ : น้ำตาล เท่ากับ 100 : 2 : 1

วิธีการเตรียมปลาช่อนแดดเดียว

1. นำปลามาทำการตัดหัว ขอดเกล็ด ควักไส้ แล้วเนื้อปลาแล้วกรีดเป็นริ้ว 4 ริ้ว หลังจากนั้นนำมาทำความสะอาดโดยการล้างด้วยน้ำเปล่า
2. นำส่วนผสมที่เตรียมไว้มาผสมให้เข้ากับตัวปลาแล้วหมักทิ้งไว้ 30 นาที
3. ทำความสะอาดอีกครั้งเพื่อล้างในส่วนที่เป็นฟองและเมือกออก
4. สำหรับตัวอย่างที่มีการใช้กรดอะซิติก กรดซิตริก และกรดแลคติก จะแช่ปลาในสารละลายกรดตามความเข้มข้นที่กำหนด โดยใช้อัตราส่วนระหว่างปลากับสารละลายกรดเท่ากับ 1 : 2.5 (w/v) ใช้เวลาในการแช่ 2 นาที (ณัฐฐา และ คณะ, 2551)
5. นำมาอบที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่กำหนด

ตอนที่ 1 ศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการอบปลาช่อนแดดเดียว

ทำการปรับปรุงกระบวนการผลิตปลาช่อนแดดเดียวที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดปริมาณความชื้น ค่า  $a_w$  และปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลงมากที่สุด แต่ผลิตภัณฑ์ยังคงมีลักษณะทางด้านประสาทสัมผัสเป็นที่ยอมรับจากผู้บริโภค

#### 1.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการอบปลาช่อนแดดเดียว

ทำการทดลองโดยนำปลาช่อนที่เตรียมไว้ตามวิธีข้างต้นมาเรียงไว้บนตะแกรง นำไปอบในตู้อบลมร้อนแบบถาดโดยใช้อุณหภูมิ 2 ระดับ คือ 55 และ 60 องศาเซลเซียส ทำการสุ่มตรวจทุก ๆ 4 ชั่วโมง คือ 0, 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่สุ่มมาเก็บในถุงพลาสติก LDPE แบบ ziplock ขนาด  $10 \times 10$  นิ้ว เพื่อทำการวิเคราะห์

1.1.1 ทางเคมี ได้แก่ ปริมาณความชื้น (AOAC, 1990)

1.1.2 ทางกายภาพ ได้แก่ ค่า  $a_w$  (AOAC, 1990)

#### 1.2 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการอบปลาช่อนแดดเดียว

นำปลาช่อนที่เตรียมจากวิธีข้างต้น โดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการอบจากข้อ 1.1 มาอบที่เวลาต่าง ๆ คือ 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่สุ่มมาเก็บในถุงพลาสติก LDPE แบบ ziplock ขนาด  $10 \times 10$  นิ้ว เพื่อทำการประเมินคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสก่อนทอด โดยวิธี line scale 0-10 และหลังทอด โดยวิธี 9 points hedonic scale โดยใช้ผู้ทดสอบชิมจำนวน 10 คน ที่ผ่านการฝึกฝนมาแล้ว (trained panelists) ใช้แบบทดสอบดังแสดงในภาคผนวก ข

ดำเนินการทดลองแบบ CRD สำหรับข้อ 1.1 และแบบ RCBD สำหรับข้อ 1.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างตัวอย่างโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตอนที่ 2 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของกรดอะซิติก กรดซิตริก และกรดแลคติก ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

ทำการศึกษาการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายในอาหารและถูกกำหนดปริมาณในมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน: ปลาแดดเดียว โดยศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของกรดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) เพื่อยืนยันสมมติฐานที่ว่ากรดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ และใช้เป็นแนวทางในการเลือกความเข้มข้นของกรดที่เหมาะสมในการใช้กับผลิตภัณฑ์ต่อไป

ทดสอบผลของกรดอินทรีย์ 3 ชนิด คือ กรดอะซิติก กรดซิตริก และกรดแลคติก ในการยับยั้ง *S. aureus* และ *E. coli* โดยใช้ระดับความเข้มข้นของกรด ร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 (v/v) ทำการวิเคราะห์

2.1 ทางเคมี ได้แก่ ค่า pH (AOAC, 1990)

2.2 ทางจุลินทรีย์ ได้แก่ ปริมาณเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* (AOAC, 1990)

ดำเนินการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับข้อ 2.1 และ 2.2

ตอนที่ 3 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดอะซิติก กรดซิตริก และกรดแลคติก เมื่อนำมาใช้กับปลาช่อนแดดเดียว

นำกรดอะซิติก กรดซิตริก และกรดแลคติก มาประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์ปลาช่อนแดดเดียว โดยใช้ในระดับที่เพียงพอต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เสื่อมคุณภาพ แต่ปริมาณการใช้อยู่ในระดับที่ผู้บริโภคยอมรับ

ทำการทดลองโดยนำปลาช่อนที่เตรียมจากตอนที่ 2 มาแช่ในกรดอะซิติก กรดซิตริก และกรดแลคติกที่ระดับความเข้มข้น 5 ระดับ คือ ความเข้มข้นร้อยละ 0 (ตัวอย่างควบคุม), 1, 2, 3 และ 4 ตัวอย่างควบคุมคือตัวอย่างที่ทำการแช่น้ำกลั่น โดยใช้อัตราส่วนระหว่างปลากับสารละลายกรด เท่ากับ 1 : 2.5 (w/v) (ณัฐฐา และ คณะ, 2551) ใช้เวลาในการแช่ 2 นาที แล้วจึงนำไปอบในตู้อบลมร้อนโดยใช้อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมจากตอนที่ 2 จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาเก็บในถุงพลาสติก LDPE แบบ ziplock ขนาด 10 × 10 นิ้ว เพื่อทำการวิเคราะห์

3.1 ทางกายภาพ ได้แก่ ค่าสี และค่า  $a_w$  (AOAC, 1990)

3.2 ทางเคมี ได้แก่ ปริมาณความชื้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณกรด (AOAC, 1990)

3.3 ทางจุลินทรีย์ ได้แก่ ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) ปริมาณยีสต์ และรา *S. aureus* และ *E. coli* (AOAC, 1990)

3.4 ประเมินคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสก่อนทอด และหลังทอดโดยวิธี 9 points hedonic scale โดยใช้ผู้ทดสอบชิมจำนวน 10 คน ที่ผ่านการฝึกฝนมาแล้ว (trained panelists)

ดำเนินการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับข้อ 3.1, 3.2 และ 3.3 แบบ RCBD สำหรับข้อ 3.4 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างตัวอย่างโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตอนที่ 4 ศึกษาอายุการเก็บรักษาปลาช่อนแดดเดียวที่ใช้กรดอะซิติก กรดซิตริก และกรดแลคติก

โดยศึกษาผลของกรดแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่เปลี่ยนไปในระหว่างการเก็บรักษา และผลต่ออายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ที่เก็บอุณหภูมิห้อง ( $32 \pm 2$  องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิตู้เย็น ( $5 \pm 2$  องศาเซลเซียส)

ผลิตปลาช่อนแดดเดียวโดยใช้ความเข้มข้นของกรดอะซิติก กรดซิตริก และกรดแลคติกที่เหมาะสมจากตอนที่ 2 เปรียบเทียบกับปลาช่อนแดดเดียวที่ไม่ได้จุ่มกรด ทำการบรรจุในถุงพลาสติกโพลีเอทิลีน (LDPE) ในสภาวะปกติ และทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 อุณหภูมิ คือ อุณหภูมิ  $32 \pm 2$  และอุณหภูมิ  $5 \pm 2$  องศาเซลเซียส

สุ่มตัวอย่างปลาช่อนแดดเดียวเก็บที่อุณหภูมิห้อง ประเมินคุณภาพ ทุก ๆ วัน เป็นเวลา 3 วัน และอุณหภูมิตู้เย็น ประเมินคุณภาพทุก ๆ 4 วัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ หรือจนกว่าผลิตภัณฑ์ไม่เป็นที่ยอมรับ นำตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์

4.1 ทางกายภาพ ได้แก่ ค่าสี และค่า  $a_w$  (AOAC, 1990)

4.2 ทางเคมี ได้แก่ ปริมาณความชื้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรด (AOAC, 1990) ค่า PV และค่า TBA (Khalid, 2007b)

4.3 ทางจุลินทรีย์ ได้แก่ ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณยีสต์และ รา *S. aureus* และ *E. coli* (AOAC, 1990)

4.4 ประเมินคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสก่อนและหลังทอด โดยให้คะแนนความชอบแบบ 9 points hedonic scale โดยใช้ผู้ทดสอบชิมจำนวน 10 คน ที่ผ่านการฝึกฝนมาแล้ว

ดำเนินการทดลองแบบ CRD สำหรับข้อ 4.1, 4.2 และ 4.3 และแบบ RCBD สำหรับข้อ 4.4 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างตัวอย่างโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05