

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 สารทดสอบ

สารสกัดชาเขียวในรูปแบบผงได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ. ดร. นันทวัน บุญยะประภัศร ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยในผงชาเขียว 100 มิลลิกรัมจะมีสารคาเทชินอยู่ 12.94 มิลลิกรัม ซึ่งมีองค์ประกอบของสาร 4 ชนิด คือ

1. คาเทชิน (catechin, C) 5.16153 มิลลิกรัม
2. อีพิกาทะชิน (epicatechins, EC) 3.65128 มิลลิกรัม
3. อีพิกาทะชินแกลเลต (epicatechin gallate, ECG) 2.31287 มิลลิกรัม
4. อีพิกัลโลคาเทชินแกลเลต (epigallocatechin gallate, EGCG) 1.81673 มิลลิกรัม

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือในการวิเคราะห์

- 3.2.1 ตู้เขี่ยเชื้อ (DWYER instruments INC, U.S.A)
- 3.2.2 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (WTB Binder, Germany)
- 3.2.3 ไมโครปิเปต (Thermo Scientific, Finland)
- 3.2.4 เครื่องตีบดตัวอย่าง (Interscience, France)
- 3.2.5 ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot air oven: Memmert, Belgium)
- 3.2.6 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Fx-2000i, Japan)
- 3.2.7 เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง (Vortex ganie 2G-560E, USA)
- 3.2.8 ไมโครเวฟ (Turbora, Korea)
- 3.2.9 หม้อนิ่งฆ่าเชื้อ (Hirayama, Japan)
- 3.2.10 ตู้แช่แข็ง -20 °C (SANDEN, Thailand)
- 3.2.11 เครื่องชั่งไฟฟ้า (3 ตำแหน่ง) (Sarorius, Basic, Japan)
- 3.2.12 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu model UV – 1601, Japan)
- 3.2.13 เครื่องโฮโมจีไนซ์เซอร์ (Homogenizer) (Ultra tarrax, Germany)
- 3.2.14 เครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอน (Hettich Zentrifugen EBA 20, Germany)
- 3.2.15 เครื่องวิเคราะห์โปรตีน (Gerhardt model Vapodest 30, Germany)
- 3.2.16 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath, Memmert, Germany)
- 3.2.17 เครื่องวัดค่า water activity (Novasina, Switzerland)
- 3.2.18 เครื่องวัดค่าความชื้น (Moisture analyzer, Hobart, USA.)
- 3.2.19 เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์ต่างๆ

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการผลิตหมูหวาน

3.3.1 เครื่องบดเนื้อรูปดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 mm. (Blender) (Moulinex, Germany)

3.3.2 เครื่องผสม (Dito Sama K-55, Germany)

3.3.3 เครื่องอบลมร้อน (Patch OV 663, Thailand)

3.3.4 เตาอบแก๊ส (Thailand)

3.3.5 เครื่องบรรจุสุญญากาศ (Vacuum) (Ramon, Germany)

3.3.6 ถุงสุญญากาศชนิด (K – Nylon/LLDPE)

3.3.7 เครื่องชั่ง (Mettler Toledo PL 1502-S, Germany)

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1 Agar (Criterion, U.S.A)

3.4.2 Peptone (Merck, Germany)

3.4.3 Plate Count Agar (Merck, Germany)

3.4.4 Malt extract (Merck, Germany)

3.5 สารเคมี

3.5.1 Dipotassium hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4)

3.5.2 Potassium dihydrogen orthopsphate (KH_2PO_4)

3.5.3 2 - Thiobarbituric acid

3.5.4 90% Acetic acid

3.5.5 anti-foaming agent ได้แก่ 1 – Octanal 99 % (Panreac, Spain)

3.5.6 2- Thiobarbituric acid (TBA) (Sigma, Germany)

3.5.7 1,1,3,3 – Tetraethoxypropane (Sigma, Germany)

3.5.8 Butylated Hydroxytoluene (BHT) (Fluka, Japan)

3.5.9 Hydrochloric acid (Merck, Germany)

3.5.10 Ethanol 95 เปอร์เซ็นต์

3.5.11 โซเดียมคลอไรด์ (Ajax Finechem, Australia)

3.6 การทำผลิตภัณฑ์หมูหวาน (ภาคผนวก ค)

3.6.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตหมูหวาน (1 กลุ่มตัวอย่าง 7.5 kg)

เนื้อหมู (สะโพก)	4.8 kg
มันหมู (นำหนังออกแล้ว)	1.2 kg
ผงเพรกก (ไนไตรท์)	0.058 kg
เกลือแกง (ปรงทิพย์)	0.075 kg
ซอสปรุงรส (ตราเด็กสมบูรณ์)	0.069 kg
ซีอิ๊วขาว (ง่วนเซียง)	0.023 kg
น้ำตาลทรายแดง (วังขนาย)	1.33 kg
ผงชูรส	0.023 kg
สารสกัดสารเขียวที่ความเข้มข้นร้อยละ	0.1 และ 0.2
BHT ที่ความเข้มข้นร้อยละ	0.1

3.6.2 ขั้นตอนการผลิตหมูหวาน

1) การเตรียมหมูหวานจะใช้เนื้อหมูบริเวณสะโพกตัดแต่งส่วนของไขมันด้านนอกแล้วนำมาหั่นและบดผ่านแวนที่มีรูตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร ส่วนมันแข็งนำมาหั่นและบดผ่านแวนที่มีรูตะแกรงขนาดเดียวกัน

- 2) นำเนื้อสะโพกหมูบดและมันแข็งบดมาผสมให้เข้ากัน
- 3) นวดเนื้อสะโพกกับมันหมูเติมเกลือและผงเพรกกจนจนเหนียว
- 4) เติมเครื่องปรุงรสส่วนที่เหลือแล้วนวดต่อ
- 5) แบ่งส่วนผสมออกเป็น 4 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม

กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่เสริมสารสกัดชาเขียว ร้อยละ 0.1

(100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเนื้อและไขมัน)

กลุ่มที่ 3 กลุ่มที่เสริมสารสกัดชาเขียว ร้อยละ 0.2

(200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเนื้อและไขมัน)

กลุ่มที่ 4 กลุ่มที่เสริมบีเอชที ร้อยละ 0.1 (100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเนื้อและไขมัน)

- 6) หมักไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7) นำมาขึ้นรูปบีบเป็นเส้นตามที่ต้องการ แล้วนำไปตากแดด 2 ชั่วโมง (โดยกลับด้านทุกๆ 1 ชั่วโมง) นำไปอบด้วยเครื่องอบลมร้อน 2 ชั่วโมง ทำการปรุงรสด้วยตูบแก๊สที่ อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 -15 นาที

3.7 ขั้นตอนการทดลอง

3.7.1 ศึกษาผลของสารสกัดชาเขียวและระยะเวลาการเก็บรักษาต่อคุณภาพของหมูหวานที่บรรจุถุงสุญญากาศ

ทำหมูหวานตามวิธีดังกล่าว โดยมี 4 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่เสริม BHT ร้อยละ 0.1 กลุ่มที่เสริมสารสกัดชาเขียวที่ระดับความเข้มข้น ร้อยละ 0.1 และ 0.2 จากนั้นบรรจุถุงพอลิเอทิลีน (Polyethylene : PE) ในสภาพสุญญากาศ เก็บที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นสุ่มตรวจที่ 0, 2 และ 4 สัปดาห์ มาวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ราและยีสต์ ค่าการออกซิเดชันของไขมัน โดยวิธี Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) ค่า water activity (A_w) เปอร์เซ็นต์ความชื้น (%MC) การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

3.7.2 ศึกษาผลของสารสกัดชาเขียวและระยะเวลาการเก็บรักษาต่อคุณภาพของหมูหวานที่บรรจุถุงแบบไม่สุญญากาศ

ทำหมูหวานตามวิธีดังกล่าว โดยมี 4 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่เสริมบีเอชที ร้อยละ 0.1 กลุ่มที่เสริมสารสกัดชาเขียวที่ระดับความเข้มข้น ร้อยละ 0.1 และ 0.2 จากนั้นบรรจุถุงพอลิเอทิลีน (Polyethylene : PE) แบบไม่สุญญากาศ เก็บที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นสุ่มตรวจที่ 0, 2 และ 4 สัปดาห์ มาวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ราและยีสต์ ค่าการออกซิเดชันของไขมัน โดยวิธี Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) ค่า water activity (A_w) เปอร์เซ็นต์ความชื้น (%MC) การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

3.8 ขั้นตอนการศึกษาและการเก็บข้อมูล

3.8.1 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) (AOAC, 2006)

สุ่มตัวอย่างเนื้อสันนอกสุกรบดที่ป่มในระยะเวลาต่างๆ 25 กรัม ในสารละลาย 0.1% peptone ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:10 ทำจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสมในแต่ละช่วงระยะเวลาการป่ม จากนั้นดูดสารละลายเจือจางที่ 3 ระดับความเจือจางสุดท้ายความเจือจางละ 1 มิลลิลิตร และถ่ายลงในจานเพาะเชื้อ เทอาหาร Plate Count Agar ลงจานเพาะเชื้อ ปริมาตรจานละ 15 – 20 มิลลิลิตร ที่ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ รอจนอาหารแข็งแล้วคว่ำจานเพาะ

เชื้อ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์เฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30-300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g (AOAC, 2006)

3.8.2 ราและยีสต์ (Yeast & Mold) (AOAC, 2006)

สุ่มตัวอย่างเนื้อสันนอกสุกรบดที่บ่มในระยะเวลาต่างๆ 25 กรัม ในสารละลาย 0.1% peptone ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:10 ทำจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสมในแต่ละช่วงเวลากการบ่ม จากนั้นดูดสารละลายเจือจาง 1 มิลลิลิตร และถ่ายลงในจานเพาะเชื้อ เทอาหาร Malt Agar ลงจานเพาะเชื้อปริมาตรจานละ 15 – 20 มิลลิลิตรที่ระดับความเจือจางละ 2 ข้ำ รอจนอาหารแข็งแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นำมานับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และรายงานผลเฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30-300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g (AOAC, 2006)

3.8.3 การหาค่าการออกซิเดชันของไขมัน โดยวิธี โดยวิธี Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) ดัดแปลงจากวิธีของ Castellini, C. et al. (2002)

- 1) นำตัวอย่างมาบดให้ละเอียดแล้วชั่งตัวอย่างละ 10.0 กรัมใส่บีกเกอร์
- 2) เติม 50 mM Potassium phosphate 9 มิลลิลิตร 0.2% Butylated hydroxytoluene(BHT) 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตรลงในตัวอย่างเนื้อบด จากนั้นนำมาปั่นด้วยเครื่อง homogenizer ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 นาที ใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีน
- 3) ก่อนกลั่นจะเติม 4 N Hydrochloric acid (4 N HCl) 1.25 มิลลิลิตร
- 4) เติม anti-foaming agent ประมาณ 5 - 6 หยด
- 5) นำหลอดย่อยโปรตีนต่อเข้ากับชุดเครื่องกลั่น จากนั้นกลั่นจนได้ของเหลวใน flask ประมาณ 50 มิลลิลิตร และปิดด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์
- 6) นำสารละลายที่กลั่นได้มาปริมาณ 5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วเติม 0.069 M 2-Thiobarbituric acid (TBA) 5 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า
- 7) นำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 นาที เขย่าทุกๆ 5 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์
- 8) เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนดแล้ว นำไปทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในน้ำแข็ง แล้ว

วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตรเทียบกับ 100 mM 1,1,3,3- Tetraethoxypropane (TEP) (Stock MDA)

9) คำนวณค่า TBA Value แล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

$$\text{TBA Value (mg MDA/ kg meat)} = (X \times 10 \times 72) / (Wt \times 1000)$$

เมื่อ 72 = น้ำหนักโมเลกุลของ MDA

X = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

10 = dilution (สารละลาย MDA 50 มิลลิลิตร แต่นำมาใช้ 5 มิลลิลิตร)

Wt = น้ำหนักตัวอย่าง

3.8.4 ค่า water activity (A_w) (ดัดแปลงมาจากวิธีการของนภา โล่ห์ทอง. 2529)

นำตัวอย่างหมูหวานที่ทำการวัดค่า water activity (A_w) ปริมาณ 3 กรัม ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในภาชนะสำหรับใช้วิเคราะห์ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ทำการวัดด้วยเครื่องวัดค่า water activity (A_w) แล้วบันทึกผลที่ได้

3.8.5 ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น(%MC)

นำตัวอย่างหมูหวาน 3 กรัม ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในภาชนะสำหรับใช้วิเคราะห์ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ด้วยเครื่องวัด Moisture analyzer (Hobart, USA.)

3.8.6 การศึกษาคุณภาพด้านประสาทสัมผัสโดยใช้แบบทดสอบ

ทำการทดสอบความชอบทางด้านสี ด้านกลิ่น ด้านรสชาติ ด้านความชอบโดยรวมของผลิตภัณฑ์โดยใช้แบบทดสอบ (ช่วงการให้คะแนนจาก 1 (ไม่ชอบมาก) ถึง 5 (ชอบมาก) (ภาคผนวก ค)

3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ราและยีสต์ ค่าการออกซิเดชันของไขมัน (TBARS) ค่า water activity (A_w) เปอร์เซ็นต์ความชื้น (%MC) และการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Complete Randomized Design, CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป และ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์