

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 ขอบเขตงานวิจัย

วัตถุประสงค์	กิจกรรม
<u>การทดลองที่ 1</u> ศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง ขจร มะม่วงหาวมะนาวโห่ มะตูม และโสน เพื่อนำมาใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติที่ใช้ถนอมผลิตภัณฑ์อาหารในเชิงพาณิชย์	สกัดสารจากพืชทดสอบด้วยเอทานอลและน้ำ 1.1 ทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยวิธีไฮโดรเจนอะตอม 1.2 ทดสอบความสามารถในการแย่งจับกับโลหะ Fe^{2+} (Metal chelating activity) ของสารสกัดพืชทดสอบ 1.3 ทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัดพืชทดสอบ 1.4 ทดสอบความสามารถในการยับยั้ง lipid peroxidation จากพืชทดสอบ 1.5 ทดสอบปริมาณกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากพืชทดสอบ 1.6 ทดสอบผลของความร้อนต่อประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชทดสอบ
<u>การทดลองที่ 2</u> ศึกษาความสามารถของสารสกัดจาก กระเจี๊ยบแดง ขจร มะม่วงหาวมะนาวโห่ มะตูม และโสน ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียบนอาหาร	2.1 ทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค โดยวิธี Agar well Diffusion Method (19 สายพันธุ์) 2.2 ศึกษาระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากพืชที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อเป้าหมาย โดยศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ (MBC) 2.3 ศึกษาระยะเวลาที่สารสกัดสัมผัสเชื้อต่อการลดลงของจำนวนเชื้อเป้าหมาย โดยศึกษาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดและจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บ (Cell stress) ของเชื้อบริสุทธิ์ (<i>In vitro</i>)
<u>การทดลองที่ 3</u> ศึกษาการใช้สารสกัดพืช	เลือกพืชที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่สูง และสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (จากการทดลองที่ 1 และ 2) มา

พื้นบ้านในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยการศึกษาในผลิตภัณฑ์ 2 ชนิดคือ 1. ผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรบด และ 2. ผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแห้งพร้อมรับประทาน	ใช้ในการเติมในผลิตภัณฑ์ โดยศึกษา 3.1 ผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรบด 3.1.1 ศึกษาผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงต่อคุณภาพทางด้านกายภาพ ด้านเคมี และด้านจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรบดที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลาการเก็บรักษา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน โดยศึกษาคุณสมบัติดังนี้ (1) คุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ - ค่าสี (L*, a* และ b*) - ค่าความเป็นกรด-ด่าง (2) คุณสมบัติทางเคมี ได้แก่ - การออกซิเดชันของไขมันด้วยเทคนิค Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) - ค่าการกำจัดอนุมูลอิสระ (DPPH) (3) คุณสมบัติทางด้านจุลินทรีย์ ได้แก่ - ตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์รวม - ตรวจหาจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Psychrotrophic) - ตรวจหายีสต์และรา - ตรวจหา Coliforms และ <i>E. coli</i> (4) การทดสอบทางประสาทสัมผัส ทดสอบทั้งผลิตภัณฑ์ดิบ และผลิตภัณฑ์ปรุงสุก ในการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคในผลิตภัณฑ์ดิบได้แก่ คุณลักษณะของสี กลิ่น ลักษณะความน่าซื้อ และการยอมรับโดยรวมในผลิตภัณฑ์ปรุงสุกได้แก่ การทดสอบการชิม โดยทดสอบการยอมรับ ด้านสี กลิ่น รสชาติ และความพึงพอใจโดยรวม 3.1.2 ศึกษาความสามารถของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในเนื้อสุกรบด โดยการเติมเชื้อก่อโรค <i>S. aureus</i> และ <i>Salmonella Typhimurium</i> เก็บรักษาอุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลาการเก็บรักษา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน โดยศึกษาคุณสมบัติดังนี้ จากนั้นตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเชืวดังกล่าว
---	---

	3.2 ผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแห้งพร้อมรับประทาน 3.2.1 ศึกษากระบวนการทำให้สุกเพื่อผลิตหมูหวานพร้อมรับประทาน 2 วิธี ได้แก่ 3.2.1.1 อบให้มีอุณหภูมิใจกลางผลิตภัณฑ์หมูหวาน 71 °C ด้วยอุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นอบที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที 3.2.1.2 อบให้มีอุณหภูมิใจกลางผลิตภัณฑ์หมูหวาน 71 °C ด้วยอุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นอบที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที และนำไปย่างด้วยอุณหภูมิ 180 °C เป็นเวลา 6 นาที โดยติดตามวิเคราะห์คุณสมบัติต่าง ๆ ดังนี้ (1) คุณภาพด้านกายภาพ ได้แก่ - เปอร์เซ็นต์ผลได้ของผลิตภัณฑ์หลังทำแห้ง (% Drying yield) - ค่าวอเตอร์แอคทิวิตี (Water activity measurement) - ค่าความชื้น (Moisture content) - ค่าสี (CIE L*a*b*) - ลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ด้วยรูปแบบค่าแรงเฉือน (shear force) - ลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ด้วยรูปแบบ Texture Profile Analysis (2) คุณภาพทางประสาทสัมผัส (3) ศึกษาความอยู่รอดของเชื้อ <i>S. aureus</i> และ <i>E. coli</i> ในเนื้อกึ่งแห้งพร้อมรับประทานเมื่อผ่านกระบวนการอบแห้งที่แตกต่างกัน
--	---

	3.2.2 ศึกษาผลของบรรจุภัณฑ์ต่อคุณภาพด้านกายภาพและด้านเคมีของผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแห้งพร้อมรับประทาน โดยวิเคราะห์ด้านต่างๆ ดังนี้ (1) คุณภาพด้านกายภาพ ได้แก่ - เปอร์เซ็นต์ผลได้ของผลิตภัณฑ์หลังทำแห้ง (% Drying yield) - ค่าออกเตอร์แอคติวิตี (Water activity measurement) - ค่าความชื้น (Moisture content) - ค่าสี (CIE L*a*b*) - ลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ด้วยรูปแบบค่าแรงเฉือน (shear force) - การออกซิเดชันของไขมันด้วยเทคนิค Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) (2) คุณภาพด้านจุลินทรีย์ ได้แก่ - จำนวนจุลินทรีย์รวม - <i>S. aureus</i> - ยีสต์และรา - Coliforms และ <i>E. coli</i> (3) คุณภาพทางประสาทสัมผัส 3.2.3 ศึกษาผลของสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อคุณภาพด้านต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแห้งพร้อมรับประทาน แปรรูปผลิตภัณฑ์ตามกรรมวิธีการผลิตที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 3.2.1) และเติมสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระดับความเข้มข้น 0.2, 0.4 และ 0.6% ตรวจวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์หมูหวานพร้อมรับประทานเป็นเวลา 2 เดือน วิเคราะห์ตัวอย่างทุก 2 สัปดาห์ โดยศึกษาคุณสมบัติดังนี้ (1) คุณภาพทางกายภาพ - เปอร์เซ็นต์ผลได้ของผลิตภัณฑ์หลังทำ
--	--

	แห้ง (% Drying yield) - ค่าวอเตอร์แอกติวิตี (Water activity measurement) - ค่าความชื้น (Moisture content) - ค่าสี (CIE L*a*b*) - การเปลี่ยนแปลงค่าสีน้ำตาล (Browning Index) - ค่าความเป็นกรด-ด่าง - ลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ด้วยรูปแบบค่าแรงเฉือน (shear force) - ลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ด้วยรูปแบบค่าแรง Texture Profile Analysis (TPA) (2) คุณภาพทางเคมี - การออกซิเดชันของไขมันด้วยเทคนิค Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) - ค่าการกำจัดอนุมูลอิสระ (DPPH) (3) คุณภาพด้านจุลินทรีย์ - จำนวนจุลินทรีย์รวม - <i>S. aureus</i> - ยีสต์และรา - Coliforms และ <i>E. coli</i> (4) คุณภาพทางประสาทสัมผัส 3.2.4 เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแห้งพร้อมรับประทาน หลังจากได้ผลิตภัณฑ์หมูหวานพร้อมรับประทานที่มีคุณภาพทางด้านการบริโภค (สี กลิ่น รสชาติ และลักษณะเนื้อสัมผัส) และมีความปลอดภัยทางด้านการบริโภค รวมทั้งมีความคงตัวในระหว่างการเก็บรักษาที่เหมาะสมแล้วนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (proximate composition) ในด้านต่างๆ ดังนี้ - ความชื้น - ไขมัน
--	---

	- โปรดีน - คาร์โบไฮเดรต - เกล้า
--	---

3.2 เชื้อแบคทีเรียทดสอบ

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรียทดสอบ อาหารที่ใช้เลี้ยง และอุณหภูมิสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย

Microorganisms	Media	Temp. (°C)
Meat pathogenic bacteria		
<i>Salmonella</i> Typhimurium TISTR 292	TSB-YE	37
<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 118	TSB-YE	37
<i>Escherichia coli</i> TISTR 780	TSB-YE	37
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 ^T	TSB-YE	37
<i>Aeromonas hydrophila</i> TISTR 1321	TSB-YE	30
Meat spoilage bacteria		
<i>Pseudomonas fluorescens</i> JCM 5963 ^T	TSB-YE	26
<i>Pseudomonas fluorescens</i> TISTR 358	TSB-YE	26
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1149	MRS	30
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM1157 ^T	MRS	30
<i>Lactobacillus sakei</i> TISTR 890	MRS	37
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14947	MRS	30
<i>Lactococcus cremoris</i> TISTR 1344	MRS	30
<i>Lactococcus lactis</i> 19435	MRS	30
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> JCM 6124 ^T	MRS	30
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> TISTR 942	MRS	30
<i>Enterococcus faecalis</i> TISTR 888	MRS	37
<i>Streptococcus</i> sp. TISTR 1030	MRS	30
Other bacteria found in food		
<i>Bacillus coagulans</i> TISTR 1447	TSB-YE	37
<i>Bacillus subtilis</i> JCM 1465	TSB-YE	37

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Md

JCM = Japanese Culture of Microorganism, Wako, Japan

TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Thailand

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1) เครื่องบดเนื้อรูปคylinder ผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
- 2) เครื่องสับผสม (Seydelmann, Germany)
- 3) ตู้อบลมร้อน (Binder, USA)
- 4) เตาอ่างควบคุมอุณหภูมิ
- 5) เครื่องชั่งชนิดหยาบ (Tanita model 1144, Tanita Corporation, Japan)
- 6) เครื่องชั่งชนิดละเอียด (Sartorius, Basic, Germany)
- 7) ตู้เป่าเชื้อ Laminar Flow (Dwyer model merk II, USA)
- 8) ตู้บ่มเพาะเชื้อจุลินทรีย์ (WTB Binder model BD, Germany)
- 9) ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot-air oven, Memmert model CM500, Germany)
- 10) หม้อนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (Auto clave, Hirayama model HVE 50, Japan)
- 11) อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath, Memmert, Germany)
- 12) เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer KMC-1300V, Korea)
- 13) เครื่องตีปั่นไฟฟ้า (Stomacher Bag Mixer 400 model VW, France)
- 14) ไมโครเวฟ (Toshiba)
- 15) เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์อื่น ๆ ที่จำเป็น
- 16) ไมโครปิเปต ขนาด 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
- 17) เครื่องวิเคราะห์ค่า Water activity (Novasina, Switzerland)
- 18) เครื่องวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (Warner-Bratzler, Instron Model 1011)
- 19) เครื่องวัดค่าสีของเนื้อ (Hunterlab Mini Scan EZ, USA)
- 20) เครื่อง Homogenizer (Ultra tarrax, Germany)
- 21) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Shimadzu model UV – 1601, Japan)
- 22) เครื่องบรรจุสุญญากาศ (Ramon, Germany)
- 23) ถุงสุญญากาศชนิด K-Nylon/LLDPE
- 24) เจอร์ก็กัน (LEM, USA)
- 25) Spectrophotometer (Shimadzu model UV-1601, Japan)

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1) Agar	(Criterion, USA)
2) Baird-Parker agar	(Merck, Germany)
3) Chromocult	(Merck, Germany)
4) DEV Tryptophan broth	(Merck, Germany)
5) EC broth	(Merck, Germany)
6) Eosin Methylene Blue (EMB) agar	(Merck, Germany)
7) Brilliant Green Lactose Bile (BGLB)	(Merck, Germany)
8) Hekoten-Enter-Agar	(Merck, Germany)
9) Lauryl Sulfate broth	(Merck, Germany)
10) Malt extract	(Merck, Germany)
11) Lysine-Indole-Motility (LIM) medium	(Difco, USA)
12) MRS broth	(Merck, Germany)
13) Methyl red-Voges Proskauer (MR-VP) broth	(Merck, Germany)
14) Plate count agar	(Merck, Germany)
15) Simmons citrate agar	(Merck, Germany)
16) Tryptic Soy Broth (TSB)	(Merck, Germany)
17) Tetrathionate broth (TTB)	(Merck, Germany)
18) Selenite cysteine broth (SCB)	(Merck, Germany)
19) Salmonella-Shigella (SS) agar	(Merck, Germany)
20) Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar	(Merck, Germany)
21) Triple sugar iron (TSI) agar	(Merck, Germany)
22) Yeast extract granulated	(Merck, Germany)
23) Mueller Hinton Broth (MHB)	(Merck, Germany)
24) Potassium tellurite-hydrate	(Merck, Germany)
25) 2 – Thiobarbituric acid (TBA)	(Sigma, Germany)
26) Trichloroacetic acid	(Merck, Germany)
27) 1,1,3,3 – Tetraethoxypropane	(Sigma, Germany)
28) 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	(Sigma, Germany)
29) 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman- 2-carboxylic acid (Trolox)	(Sigma, Germany)

30) Hydrochloric acid fuming 37%	(Merck, Germany)
31) Ethanol 99%	(Merck, Germany)
32) Methanol	(Merck, Germany)
33) Dipotassium hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4)	(Univer, New Zealand)
34) Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)	(Univer, New Zealand)

3.5 ระเบียบวิธีวิจัย การศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระเจียบแดง ขจร มะม่วงหาวมะนาวโห่ มะตูม และโสน เพื่อนำมาใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติที่ใช้ถนอมผลิตภัณฑ์อาหารในเชิงพาณิชย์ แบ่งออกเป็น 6 การทดลองย่อย ดังนี้

ขั้นตอนการสกัด

การสกัดสารจากกระเจียบแดง ขจร มะม่วงหาวมะนาวโห่ มะตูม และ โสน โดยนำพืช 5 ชนิด ได้แก่ กระเจียบแดง ขจร มะม่วงหาวมะนาวโห่ มะตูมและ โสนไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แบ่งพืชทดสอบเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มหนึ่งสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน ในขณะที่กลุ่มที่ 2 สกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ทำการแยกสารสกัดจากพืชด้วยน้ำและเอทานอลโดยการกรองผ่านกรวยโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 แยกส่วนกากเอาแต่ส่วนที่เป็นของเหลว กรองซ้ำ 2 รอบ เพื่อลดการตกค้างของเศษพืช

การทดลองที่ 1.1 ทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธีไฮโดรเจนอะตอม

การศึกษาความสามารถของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธีให้ไฮโดรเจน อะตอม นำสารสกัดจากพืชทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 2 มิลลิลิตรทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองกับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 100 μ M จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จึงนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Miliauskas *et al.* 2004) ทำการทดสอบอย่างละ 3 ซ้ำบันทึกค่าการดูดกลืนแสง และนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging capacity) คำนวณค่า IC_{50} จากกราฟระหว่างค่า log ของความเข้มข้น และเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อหาความสัมพันธ์และสมการเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดกับเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและค่า regression

การทดลองที่ 1.2 ทดสอบความสามารถในการแย่งจับกับโลหะ Fe^{2+} (Metal chelating activity) ของสารสกัดพืชทดสอบ

การวิเคราะห์ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะ Fe^{2+} (metal chelating activity) ของสารสกัดจากพืชทดสอบ นำสารสกัดจากพืชทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 1 มิลลิลิตรทำปฏิกิริยากับสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO_4) ความเข้มข้น 2 mM ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและเติมสารละลาย Ferrozine ความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Singh and Rajini, 2004) ทำการทดสอบอย่างละ 3 ซ้ำบันทึกค่าการดูดกลืนแสงและนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะ Fe^{2+}

การทดลองที่ 1.3 ทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัดพืชทดสอบ

การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัดจากพืชทดสอบ นำสารสกัดจากพืชทดสอบ 5 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 1 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 M ที่ pH 6.6 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และสารละลาย $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1% ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 10% TCA ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงนาน 10 นาที เก็บสารละลายส่วนบน ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และสารละลาย 0.1% FeCl_3 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง นำไปคำนวณความสามารถในการรีดิวซ์ในรูปมิลลิกรัมของกรดแกลลิก (Gallic acid: GAE) ต่อกรัมของสารสกัด โดยคำนวณจากกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Chan *et al.* 2007)

การทดลองที่ 1.4 ทดสอบความสามารถในการยับยั้ง lipid peroxidation จากพืชทดสอบ

การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้ง lipid peroxidation ของสารสกัดจากพืชทดสอบ เติมสารละลายไข่แดงเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตรในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต จำนวน 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารสกัดจากพืชทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 1 มิลลิลิตรแล้วตามด้วยสาร FeSO_4 เข้มข้น 1000 μM จำนวน 100 ไมโครลิตรนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นแบ่งสารละลายที่ได้จำนวน 1 มิลลิลิตร เติมสาร Thiobarbituric acid (ละลายใน trichloroacetic acid 20%) เข้มข้น 0.5 % จำนวน 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาเข็นน้ำแข็งทันที นำไปหมุนเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น

532 nm ส่วนหลอดควบคุมเติมสารละลายไข่แดงและสาร FeSO_4 นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด lipid peroxidation (Kuppusamy *et al.* 2002)

การทดลองที่ 1.5 ทดสอบปริมาณกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากพืชทดสอบ

การวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) ในสารสกัดจากพืชทดสอบ นำสารสกัดจากพืชทดสอบ ที่ความเข้มข้น 5000 ppm จำนวน 1 มิลลิลิตรทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้เป็นเวลาประมาณ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5 % ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นจึงนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Kahkonen *et al.* 1999) ทำการทดสอบอย่างละ 3 ซ้ำ และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยเปรียบเทียบกับสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

การทดลองที่ 1.6 ทดสอบผลของความร้อนต่อประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชทดสอบ

การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล Hydroxyl ($\text{OH}^\bullet$) ของสารสกัดจากพืชทดสอบ นำสารสกัดจากพืชทดสอบ 5 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำปฏิกิริยากับ deoxyribose เข้มข้น 3.75 mM H_2O_2 เข้มข้น 1 mM potassium phosphate buffer เข้มข้น 20 mM ที่ pH 7.4 FeCl_3 เข้มข้น 0.1 mM EDTA เข้มข้น 0.1 mM และวิตามินซี เข้มข้น 0.1 mM ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม 1% thiobarbituric acid จำนวน 1 มิลลิลิตร และ 2.8% (w/v) trichloroacetic acid จำนวน 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที ทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำแข็ง จึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตรทำการทดสอบอย่างละ 3 ซ้ำ บันทึกค่าการดูดกลืนแสงและนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์ด้านการกำจัดอนุมูล hydroxyl (Halliwell *et al.* 1987)

การทดลองที่ 2 ศึกษาความสามารถของสารสกัดจาก กระเจี๊ยบแดง ขจร มะม่วงหาวมะนาวโห่ มะตูม และโสน ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียบนอาหาร แบ่งออกเป็น 3 การทดลองย่อย ดังนี้

วิธีการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาแสดงในตารางที่ 3.1 ได้จากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ โดยทำการจัดเก็บ stock culture ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการทำการทดลอง นำ stock culture มาละลายน้ำแข็ง และทำการเจริญบนอาหารที่เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิด เป็นเวลา 22-24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้ออยู่ในสถานะ late log phase (non-stressed cells) ตามวิธีของ

Tangwatcharin *et al.* (2006) จากนั้นเตรียมสารละลายแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นแบคทีเรีย 10^8 cfu/มิลลิลิตร (McFarland standard of 0.5) เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง

การทดลองที่ 2.1 ศึกษาการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และกลุ่มก่อโรค ของสารสกัด ด้วยวิธี Agar well diffusion ตามวิธีของ Perez (1990) ทำการเจือจางสารสกัดแบบ two fold dilution โดยมีระดับความเข้มข้นของสารสกัด 4 ระดับ ได้แก่ 50, 25, 12.5 และ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เตรียมสารละลายแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นสุดท้ายในจานอาหาร 5×10^5 cfu/มิลลิลิตร นำ sterile cotton จุ่มในสารละลายแบคทีเรียและ swab บนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ เจาะหลุมด้วย cork-borer (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) ปิเปิดสารสกัดลงในหลุมปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมของเชื้อทดสอบ (ตารางที่ 3.1) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone หน่วยมิลลิเมตร (รวมกับเส้นผ่าศูนย์กลางของหลุม)

การทดลองที่ 2.2 ศึกษาระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากพืชที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อเป้าหมาย โดยศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (Minimum inhibition concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ (Minimum bactericidal concentration) ด้วยวิธี broth microdilution method ตามวิธีของ CLSI M7-A4 (2002) นำเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิดที่ถูกยับยั้งจากการทดลองที่ 2.1 มาทำการศึกษา ทำการเตรียมสารปิเปตลงในหลุมของ micro plate โดยมีลำดับการใส่ ดังนี้

- ใส่สารสกัดความเข้มข้นแต่ละระดับลงในหลุมปริมาตร 20 ไมโครลิตร
- ใส่อาหาร 2x TSB ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
- ใส่อาหาร 1x TSB ปริมาตร 120 ไมโครลิตร
- ใส่เชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากการทดลองที่ 2.1 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ให้มี

ระดับความเข้มข้นสุดท้ายใน microplate 5×10^5 cfu/มิลลิลิตร โดยเตรียมกลุ่มควบคุมตัวอย่างละ 3 แบบ ดังนี้

- 1) growth control คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + แบคทีเรีย
- 2) negative control คือ ตัวทำละลาย + อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + แบคทีเรีย
- 3) sterile control คือ ใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ

ปิดฝา microplate เขย่าเบาๆ ให้อาหารและเชื้อผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วทำการวัดความขุ่น จากนั้นทำการวิเคราะห์หาค่า MIC, MIC_{90} และ MBC โดยนำสารละลายในหลุมของ microplate ที่ใส ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA แล้วทำการบันทึกระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัด โดยถ้าพบการเจริญมากกว่า 500

โคโลนี เป็นค่า MIC หากพบการเจริญอยู่ในช่วง 5-500 โคโลนี เป็นค่า MIC₉₀ และถ้าพบการเจริญไม่เกิน 5 โคโลนี เป็นค่า MBC ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายแบคทีเรียได้ไม่น้อยกว่า 99.9% ของจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น

การทดลองที่ 2.3 ศึกษาระยะเวลาที่สารสกัดสัมผัสเชื้อต่อการลดลงของจำนวนเชื้อเป้าหมาย โดยศึกษาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดและจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บ (Cell stress) ของเชื้อบริสุทธิ์ (*In vitro*) โดยศึกษาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดและจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บ (Cell stress) ของเชื้อบริสุทธิ์ (*In vitro*) ตามวิธีของ Tangwatcharin *et. al.* (2006) โดยเลือกระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำลายแบคทีเรียได้ (MBC) จากการทดลองที่ 2.2 ทำการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียที่เหลืออยู่ภายหลังสัมผัสสารสกัดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่ระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 และ 20 นาที สำหรับเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 และที่ระยะเวลา 0, 1, 2 และ 3 นาที สำหรับเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 (สารสกัดกระเจียบแดง) ที่ระยะเวลา 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 นาที สำหรับเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 และที่ระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 นาที สำหรับเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 (สารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่) เพื่อหาปริมาณ total culturable cells ของแบคทีเรียทุกชนิดและจุลินทรีย์ทั้งหมด และเพาะเลี้ยงบนอาหารที่จำเพาะกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนั้น เพื่อหาปริมาณ culturable cells โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกปริมาณแบคทีเรียที่เหลืออยู่ภายหลังสัมผัสสารสกัด นำข้อมูลที่ได้ไปประมวลผลและนำเสนอเป็นค่า log cfu เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสถานะของเซลล์ในการศึกษาผลการตอบสนองทางสัณฐานวิทยาและกายภาพของเซลล์แบคทีเรียเหล่านี้เนื่องจากสถานะเครียด (Morphological and physiological responses of pathogenic bacteria to stress) โดยนำข้อมูลไปประมวลผล Population density estimate หาค่า non-stressed และ stressed cells ของแบคทีเรียแต่ละชนิด ดังสมการ

$$\begin{aligned}\text{stressed cells} &= \text{total culturable} - \text{culturable} \\ \text{non-stressed cells} &= \text{culturable}\end{aligned}$$

การทดลองที่ 3 ศึกษาการใช้สารสกัดเพื่อฟื้นฟูปื้นในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์คือ ผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรบด และผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแห้งพร้อมรับประทาน

การทดลองที่ 3.1 ศึกษาการใช้สารสกัดดอกกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์ผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรบด

3.1.1 ศึกษาผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงต่อคุณภาพทางด้านกายภาพ ด้านเคมี และด้านจุลินทรีย์ ในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรบดที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลาการเก็บรักษา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

วิธีการเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้มาคลุกกับสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่เตรียมไว้ โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มการทดลองคือ กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ระดับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร นำผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรบดขนาดแบ่งบรรจุถาดโฟม ถาดละ 150 กรัม ใช้ฟิล์มพลาสติกปิดทับ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน โดยวิเคราะห์คุณภาพดังนี้

3.1.1.1 คุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่

- ค่าสี (L^* , a^* และ b^*)
- ค่าความเป็นกรดต่าง

3.1.1.2 คุณสมบัติทางเคมี ได้แก่

- การออกซิเดชันของไขมันด้วยเทคนิค Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS)

- ค่าการกำจัดอนุมูลอิสระ (DPPH)

3.1.1.3 คุณสมบัติทางชีวภาพ ได้แก่

- ตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์รวม
- ตรวจหาจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Psychrotrophic)
- ตรวจหายีสต์และรา
- ตรวจหา Coliforms และ *E. coli*

3.1.1.4 การทดสอบทางประสาทสัมผัส ทดสอบทั้งผลิตภัณฑ์ดิบ และผลิตภัณฑ์ปรุงสุก ในการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคในผลิตภัณฑ์ดิบ ได้แก่ คุณลักษณะของสี กลิ่น ลักษณะความน่าซื้อ และการยอมรับโดยรวมในผลิตภัณฑ์ปรุงสุก ได้แก่ การทดสอบการชิม โดยทดสอบการยอมรับ ด้านสี กลิ่น รสชาติ และความพึงพอใจโดยรวม

3.1.2 ศึกษาความสามารถของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในเนื้อสุกรบด โดยการเติมเชื้อก่อโรค *S. aureus* และ *S. Typhimurium* เก็บรักษาอุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลาการเก็บรักษา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน จากนั้นตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเชื่อดังกล่าว

3.1.2.1 ความสามารถของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในเนื้อสุกรบด โดยการเติมเชื้อก่อโรค *S. aureus*

วิธีการเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้มาคลุกกับสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่เตรียมไว้ โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มการทดลองคือ กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ระดับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรลดขนาดแบ่งบรรจุถาดโฟม ถาดละ 150 กรัม ใช้ฟิล์มพลาสติกปิดทับ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

วิธีการเตรียมเชื้อทดสอบ

นำ stock culture มาละลายน้ำแข็ง และทำการเจริญบนอาหาร TSA สำหรับเชื้อ *S. aureus* เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้ออยู่ในสภาวะ late log phase (non-stressed cells) ตามวิธีของ Tangwatcharin *et. al.* (2006) จากนั้นเตรียมสารละลายแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นแบคทีเรีย 10^8 cfu/มิลลิลิตร เทียบความขุ่นกับ 0.5 McFarland standard

โดยทำการศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรบด ตามวิธีของ BAM (2001) โดยทำการเติมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 10^3 cfu/g ในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรลดขนาด จากนั้นเติมสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นที่สรุปได้จากการทดลองที่ 1.2 ลงในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรลดขนาดเข้มข้นต่างๆ นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 เก็บรักษา 10 วัน วิเคราะห์หาจำนวนการมีชีวิตรอดของ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรลดขนาดที่เติมสารสกัดแล้วก่อนเติมเชื้อและหลังเติมเชื้อ โดยสุ่มตัวอย่างหมูปคนน้ำหนัก 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในถุงพลาสติก ละลายในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง Stomacher จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:10 จากนั้นเจือจางตัวอย่าง จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นดูดสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ลงจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Baird-Parker agar (BP) ที่ผสมไข่แดง ปริมาตร 15 - 20 มิลลิลิตร โดยวิธี Spread plate ร่อนอาหารแข็งแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะกลมมน สีดำเป็นมัน ผิวเรียบ ขอบขาว มีตะกอนขุ่นรอบ ๆ โคโลนี รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์เฉพาะจานอาหารเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30 – 300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/กรัม จากนั้นสุ่มเลือกโคโลนีที่สงสัยมาวิเคราะห์การสร้างเอนไซม์ Couagulase

test โดยดูด Rabbit plasma ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงบนสไลด์ที่ทำความสะอาดแล้ว ถ่ายเชื้อลงบนสไลด์ที่มีการหยด Rabbit plasma แล้ว ทำการ smear สังเกตการเกิดเส้นใยบนสไลด์

3.1.2.1 ความสามารถของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในเนื้อสุกรบด โดยการเติมเชื้อก่อโรค *S. Typhimurium*

โดยทำการศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อ *S. Typhimurium* ในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรบด ตามวิธีของ BAM (2014) โดยทำการเติมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 10^7 cfu/g ในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรบดขนาด จากนั้นเติมสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นที่สรุปได้จากการทดลองที่ 1.2 ลงในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรบดขนาดเข้มข้นต่างๆ นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 เก็บรักษา 10 วัน วิเคราะห์หาจำนวนการมีชีวิตรอดของ *S. Typhimurium* ในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรบดขนาดที่เติมสารสกัดแล้วก่อนเติมเชื้อและหลังเติมเชื้อ โดยสุ่มตัวอย่างหมูปดน้ำหนัก 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในถุงพลาสติก ละลายในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง Stomacher จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:10 จากนั้นเจือจางตัวอย่าง จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นดูดสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ลงจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Hektoen enteric agar (HE) ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ novomyocin บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีสีน้ำเงินเขียว และตรงกลางมีสีดำ กลม นูน ผิวเรียบเป็นมัน อาจพบหรือไม่พบจุดตรงกลาง นำโคโลนีไปทำการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีโดยใช้เข็มเจาะเชื้อโคโลนีที่ส่งสัยไปเพาะลงในอาหาร lysine iron agar (LIA) และ triple sugar iron agar slant (TSI) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูผลปฏิกิริยาทางชีวเคมีในหลอด TSI agar slant และ LIA agar เชื้อ *Salmonella* spp โดยผลการทดสอบดังตารางที่ 3.4

การทดลองที่ 3.2 ศึกษาการใช้สารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ในผลิตภัณฑ์ผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแห้งพร้อมรับประทาน

3.2.1 ศึกษากระบวนการทำให้สุกเพื่อผลิตหมูหวานพร้อมรับประทาน 2 วิธี ได้แก่

3.2.1.1 อบให้มีอุณหภูมิใจกลางผลิตภัณฑ์หมูหวาน 71 °C ด้วยอุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นอบที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที

3.2.1.2 อบให้มีอุณหภูมิใจกลางผลิตภัณฑ์หมูหวาน 71 °C ด้วยอุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นอบที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที และนำไปย่างด้วยอุณหภูมิ 180 °C เป็นเวลา 6 นาที

โดยติดตามวิเคราะห์คุณสมบัติต่าง ๆ ดังนี้

(1) คุณภาพด้านกายภาพ ได้แก่

- เปอร์เซ็นต์ผลได้ของผลิตภัณฑ์หลังทำแห้ง (% Drying yield)
- ค่าสี (CIE L*a*b*)
- ลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ด้วยรูปแบบค่าแรงเฉือน (shear force)
- ลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ด้วยรูปแบบ Texture Profile Analysis

(2) คุณภาพด้านเคมี ได้แก่

- ค่าความชื้น (Moisture content)
- ค่าวอเตอร์แอคทิวิตี (Water activity measurement)

(3) วิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส

(4) ศึกษาความอยู่รอดของเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ในเนื้อกึ่งแห้งพร้อมรับประทานเมื่อผ่านกระบวนการอบแห้งที่แตกต่างกัน

3.2.2 ศึกษาผลของบรรจุภัณฑ์ต่อคุณภาพด้านกายภาพ และด้านเคมีของผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแห้งพร้อมรับประทาน

เลือกสัดส่วนไขมันที่เหมาะสมและผู้บริโภคให้การยอมรับจากการทดลองที่ 1 มาทำการ ศึกษาในบรรจุภัณฑ์ 2 ชนิด ได้แก่

3.2.2.1 บรรจุแบบสุญญากาศ (Vacuum pack)

3.2.2.2 บรรจุแบบมีอากาศภายในมีวัตถุดูดซับออกซิเจน (aerobic pack)

โดยศึกษาอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแห้งพร้อมรับประทานเป็นระยะเวลา 2 เดือน สุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษาทุก ๆ 2 สัปดาห์ เพื่อวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมี จุลินทรีย์ และประสาทสัมผัส ซึ่งผลการทดลองแสดงดังต่อไปนี้

(1) คุณภาพทางกายภาพ

- เปอร์เซ็นต์ผลได้ของผลิตภัณฑ์หลังทำแห้ง (% Drying yield)
- ค่าวอเตอร์แอคทิวิตี (Water activity measurement)
- ค่าความชื้น (Moisture content)
- ค่าสี (CIE L*a*b*)
- ลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ด้วยรูปแบบค่าแรงเฉือน (shear force)

- การออกซิเดชันของไขมันด้วยเทคนิค Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS)

(2) คุณภาพด้านจุลินทรีย์

- จำนวนจุลินทรีย์รวม
- *S. aureus*
- ยีสต์และรา
- Coliforms และ *E. coli*

(3) คุณภาพด้านประสาทสัมผัส

3.2.3 ศึกษาผลของสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อคุณภาพด้านต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแห้งพร้อมรับประทาน

แปรรูปผลิตภัณฑ์ตามกรรมวิธีการผลิตที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 3.2.1) และเติมสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระดับความเข้มข้น 0.2, 0.4 และ 0.6% ตรวจวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์หมูหวานพร้อมรับประทานเป็นเวลา 2 เดือน วิเคราะห์ตัวอย่างทุก 2 สัปดาห์ โดยศึกษาคุณสมบัติดังนี้

3.2.3.1 คุณภาพทางกายภาพ

- เปอร์เซ็นต์ผลได้ของผลิตภัณฑ์หลังทำแห้ง (% Drying yield)
- ค่าวอเตอร์แอกติวิตี (Water activity measurement)
- ค่าความชื้น (Moisture content)
- ค่าสี (CIE L*a*b*)
- การเปลี่ยนแปลงค่าสีน้ำตาล (Browning Index)
- ค่าความเป็นกรด-ด่าง
- ลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ด้วยรูปแบบค่าแรงเฉือน (shear force)
- ลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ด้วยรูปแบบค่าแรง Texture Profile Analysis (TPA)

3.2.3.2 คุณภาพทางเคมี

- การออกซิเดชันของไขมันด้วยเทคนิค Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS)
- ค่าการกำจัดอนุมูลอิสระ (DPPH)

3.2.3.3 คุณภาพด้านจุลินทรีย์

- จำนวนจุลินทรีย์รวม
- *S. aureus*
- ยีสต์และรา
- Coliforms และ *E. coli*

3.2.3.4 คุณภาพทางประสาทสัมผัส

3.2.4 เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแห้งพร้อมรับประทาน

หลังจากได้ผลิตภัณฑ์หมูหวานพร้อมรับประทานที่มีคุณภาพทางด้านการบริโภค (สี, กลิ่น, รสชาติ และลักษณะเนื้อสัมผัส) และมีความปลอดภัยทางด้านการบริโภค รวมทั้งมีความคงตัวในระหว่างการเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมแล้ว ผลิตภัณฑ์ เนื้อขึ้นรูปที่ได้จะนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และคุณค่าทางโภชนาการในด้านต่าง ๆ ดังนี้

- ความชื้น
- ไขมัน
- โปรตีน
- คาร์โบไฮเดรต
- เถ้า

3.6 ขั้นตอนการศึกษาและการเก็บข้อมูล

3.6.1 การวิเคราะห์ด้านกายภาพ

3.6.1.1 คำนวณเปอร์เซ็นต์ผลได้ของผลิตภัณฑ์หลังการทำแห้ง (% Drying yield) ของผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแห้งพร้อมรับประทาน

ทำการผสมเนื้อหมูปดกับเครื่องปรุงให้เข้ากัน จากนั้นชั่งน้ำหนักตัวอย่างก่อนผ่านกระบวนการอบ และหลังจากผ่านกระบวนการอบเสร็จ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลได้ของผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแห้งพร้อมรับประทานตามวิธีของ Murphy *et al.* (2001) ด้วยสูตร

$$\% \text{ Drying yield} = \frac{\text{น้ำหนักหลังอบ}}{\text{น้ำหนักก่อนอบ}} \times 100$$

3.6.1.2 การวัดค่าวอเตอร์แอคทิวิตี (Water activity measurement, a_w)

การวัดค่าวอเตอร์แอคทิวิตี (Water activity measurement, a_w) ของผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแห้งพร้อมรับประทานด้วยเครื่องวัดค่า a_w (Novasina, Switzerland) ตัดตัวอย่างหมูหวานกึ่งแห้งพร้อมรับประทานเป็นชิ้นเล็ก ๆ ปริมาณ 3 กรัม ใส่ลงในภาชนะสำหรับใช้วิเคราะห์ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

3.6.1.3 การวัดค่าความชื้น (Moisture content)

การหาค่าความชื้นของผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแห้งพร้อมรับประทานตามวิธีของ AOAC (2000) โดยอบภาชนะอะลูมิเนียมสำหรับหาความชื้นในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำภาชนะอะลูมิเนียมใส่ในโถดูดความชื้น และทำการชั่งน้ำหนักของภาชนะอะลูมิเนียม ปั่นตัวอย่างให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ชั่งตัวอย่าง 2-3 กรัม ใส่ในภาชนะอะลูมิเนียมและนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ทำการอบข้ามคืน โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เมื่อครบกำหนดเวลานำออกมาใส่ในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นชั่งน้ำหนักหลังอบ คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้นคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{(a - b) \times 100}{a}$$

a = น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

b = น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

3.6.1.4 การวัดค่าสี (CIE $L^*a^*b^*$) ของผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแห้งพร้อมรับประทาน

สุ่มหมูหวานกึ่งแห้งพร้อมรับประทานกลุ่มทดลองละ 3 ชิ้น มาวัดค่าสีด้วยระบบ CIE ($L^*a^*b^*$) ขึ้นละ 3 จุด ด้วยเครื่องวัดสี HunterLab Mini Scan EZ 4000L (Hunter Lab Inc., Reston, USA) เมื่อ L^* คือ ค่าความสว่าง a^* คือ ค่าสีแดง และ b^* คือ ค่าสีเหลือง

3.6.1.5 การวิเคราะห์ค่าความสดสี (Chroma) Hue angle และ Browning index

การวิเคราะห์ค่าความสดสี (Chroma) Hue angle และ Browning index ตามวิธีการอ้างอิงจาก Saricoban et al. (2010) โดยนำค่า L^* (Lightness), a^* (Redness) และ b^* (Yellowness) ที่ทำการวัดด้วยเครื่องวัดสี ColorimeterMiniScan EZ 4000L (Hunter Lab Inc, Reston, VA, USA) นำมาใช้สำหรับคำนวณหาค่าความสดสี (Chroma) (1) Hue angle (2) และ Browning index (3) จากสูตร ดังนี้

$$\text{Chroma} = \sqrt{a^* + b^*} \quad (1)$$

$$\text{Hue angle} = \arctan (b^*/a^*) \quad (2)$$

$$\text{Browning index} = \frac{[100 \times (X - 0.31)]}{0.17} \quad (3)$$

$$\text{โดย } X = \frac{(a^* + 1.75 \times L^*)}{(5.645 \times L^* + a^* - 3.012 \times b^*)}$$

3.6.1.6 การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ตามวิธีของ Carpenter *et al* (2007) โดยชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องโฮโมจีไนซ์ จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่องวัด pH meter บันทึกผล กลุ่มการทดลองละ 3 ซ้ำ

3.6.1.7 การวัดลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแข็งพร้อมรับประทาน ด้วยรูปแบบค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (shear force)

การวัดลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแข็งพร้อมรับประทานด้วยรูปแบบค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (shear force) โดยใช้หัววัด Warner-Bratzler shear ด้วยเครื่อง Instron (model 1011, USA) ตัดตัวอย่างเป็นชิ้น ขนาด 1 x 3 x 0.5 เซนติเมตร ตัวอย่างละ 10 ซ้ำ

3.6.1.8 การวัดลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแข็งพร้อมรับประทานด้วยรูปแบบ Texture Profile Analysis (TPA)

การวัดลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ด้วยรูปแบบ Texture Profile Analysis โดยใช้หัววัด Compression ด้วยเครื่อง Instron (model 1011, USA) ตัดตัวอย่างเป็นชิ้น ขนาด 1 x 3 เซนติเมตร ตัวอย่างละ 10 ซ้ำ

3.6.2 การวิเคราะห์ด้านเคมี

3.6.2.1 การหาการออกซิเดชันของไขมันในผลิตภัณฑ์ โดยวิธี 2-Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS)

การศึกษาการออกซิเดชันของไขมันด้วยเทคนิค Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) ในเนื้อสุกรปฏิบัติตามวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Buege and Aust (1987) โดยการชั่งตัวอย่างจำนวน 2 g ใส่ในหลอด 50 ml centrifugal tube และบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นใส่สารละลาย TBA ปริมาณ 10 ml นำไป Homogenize ที่ความเร็วรอบ 9500 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นให้ความร้อนในน้ำเดือด (95-100 °C) เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นโดยการเปิดน้ำไหลผ่าน และนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 5500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เก็บสารละลายส่วนใสไปทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น Blank

จากนั้นคำนวณค่าความเข้มข้นของ TBARS ที่ได้โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร 1,1,3,3 tetra-ethoxypropane และคำนวณค่า TBARS ที่แสดงในหน่วย mg MDA/kg meat

3.6.2.2 การวิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธีให้ไฮโดรเจนอะตอม (1,1-Diphenyl-2 picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay) ตามวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Qwele *et al.* 2013 : Tongnuanchan *et al.* 2012) โดยชั่งตัวอย่างจำนวน 0.5 กรัม ละลายในเอทานอลความเข้มข้น 75% ปริมาตร 20 มิลลิลิตรนำไปใส่โม่จิไนซ์ที่ความเร็วรอบ 9500 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที และนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บสารละลายส่วนใส (ตัวอย่าง) โดยดูดสารละลายส่วนใสปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.2 mM DPPH ที่ละลายด้วยเมทานอล ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นอกจากนี้เตรียมหลอดควบคุมโดยใช้เมทานอลปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และเตรียมหลอด blank ดูดสารละลายส่วนใสปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับเมทานอล 1 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (Shimadzu model UV-1601, Japan) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระจากสูตร

$$\% \text{ Inhibition of DPPH} = 1 - \frac{(\text{absorbance of sample} - \text{absorbance of blank}) \times 100}{\text{absorbance of control}}$$

3.6.3 การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

3.6.3.1 การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์รวมทั้งหมด

การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์รวมทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ ตามวิธีของ AOAC (2006) โดยสุ่มตัวอย่าง 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปตีปั่นด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 60 วินาที จากนั้นนำมาเจือจางจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นเปิดตัวอย่างและ dilution ที่เตรียมไว้จำนวน 1 มิลลิลิตร เพื่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยวิธี pour plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA หลังจากนั้นนำจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์เฉพาะจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่มีจำนวนระหว่าง 30 – 300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g

3.6.3.2 การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Psychrotrophic)

การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรสด ตามวิธีการของ Diliello (1982) โดยสุ่มตัวอย่างน้ำหนัก 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในถุงพลาสติก ละลายในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง Stomacher จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:10 จากนั้นเจือจางตัวอย่าง จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นหาคูสารละลายเจือจาง 1 มิลลิลิตร ลงจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Plate Count Agar ปริมาตร 15 - 20 มิลลิลิตร โดยวิธี Pour plate ที่ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ รอจนอาหารแข็งแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน จากนั้นนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์เฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30 – 300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g

3.6.3.3 การวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อยีสต์และรา

การวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อยีสต์และราในผลิตภัณฑ์ ตามวิธีของ AOAC (2005) โดยสุ่มตัวอย่าง 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปตีปั่นด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 60 วินาที จากนั้นนำมาเจือจางจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นปิเปตตัวอย่างและ dilution ที่เตรียมไว้จำนวน 1 มิลลิลิตร เพื่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยวิธี pour plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt agar หลังจากนั้นนำจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนับจำนวนเชื้อยีสต์และราทั้งหมด รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์เฉพาะจานอาหารเพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่มีจำนวนระหว่าง 30 – 300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g

3.6.3.4 การวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อ *S. aureus*

การวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์ ตามวิธีของ BAM (2001) โดยสุ่มตัวอย่าง 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปตีปั่นด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 60 วินาที จากนั้นนำมาเจือจางจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นปิเปตตัวอย่างและ dilution ที่เตรียมไว้จำนวน 0.1 มิลลิลิตร เพื่อการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker agar (BP) หลังจากนั้นนำจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมานับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะกลมมน สีดำเป็นมัน ผิวเรียบ ขอบขาว มีตะกอนขุ่นรอบ ๆ โคโลนี รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์เฉพาะจานอาหารเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30 – 300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g จากนั้นสุ่มเลือกโคโลนีที่สงสัยมาวิเคราะห์การสร้างเอนไซม์ Coagulase test โดยหาคู Rabbit plasma ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงบนสไลด์ที่ทำความสะอาดแล้ว ถ่ายเชื้อลงบนสไลด์ที่มีการหยด Rabbit plasma แล้วทำการ smear สังเกตการเกิดเส้นใยบนสไลด์

3.6.3.5 การวิเคราะห์หาจำนวนปริมาณเชื้อ Coliforms และ *E. coli*

การวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อ Coliforms ในผลิตภัณฑ์ ด้วยวิธี Most Probable Number (MPN) ตามวิธีของ AOAC (2005) โดยสุ่มตัวอย่าง 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในสารละลายเกลียวโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปตีปั่นด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 60 วินาที จากนั้นนำมาเจือจางจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นเปิดตัวอย่างและ dilution ที่เตรียมไว้จำนวน 1 มิลลิลิตร แต่ละระดับความเจือจางใส่ในอาหาร Lactyl sulfate tryptose broth (LST) (มีหลอด fermentation tube คว่ำอยู่ภายใน) ระดับความเจือจางละ 3 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อบ่มตามจำนวนเวลาแล้วสังเกตหลอดอาหาร LST ที่เกิดฟองแก๊ส ถ่ายเชื้อเฉพาะหลอดที่เกิดฟองแก๊ส โดยใช้ loop ใส่ในอาหาร Brilliant green lactose bile (BGLB) broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจผลหลอด BGLB ที่มีฟองแก๊สเกิดขึ้น นำค่าไปเปิดตาราง MPN รายงานผลเป็น MPN Coliform bacteria/กรัม ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ค่า Most probable numbers (MPN) ต่อตัวอย่าง 1 กรัม โดยใช้ตัวอย่าง 3 ระดับ คือ 0.1, 0.01, 0.001 กรัม

Combination of Positive	MPN	Combination of Positive	MPN	Combination of Positive	MPN
0-0-0	<3	1-1-2	15	2-2-3	42
0-0-1	3	1-1-3	19	2-3-0	29
0-0-2	6	1-2-0	11	2-3-1	36
0-0-3	9	1-2-1	15	2-3-2	44
0-1-0	3	1-2-2	20	2-3-3	53
0-1-1	6	1-2-3	24	3-0-0	23
0-1-2	9	1-3-0	16	3-0-1	39
0-1-3	1	1-3-1	20	3-0-2	64
0-2-0	6	1-3-2	24	3-0-3	95
0-2-1	9	1-3-3	29	3-1-0	43
0-2-2	1	2-0-0	9	3-1-1	75
0-2-3	1	2-0-1	14	3-1-2	120
0-3-0	9	2-0-2	20	3-1-3	160
0-3-1	1	2-0-3	26	3-2-0	93
0-3-2	1	2-1-0	15	3-2-1	150
0-3-3	1	2-1-1	20	3-2-2	210
1-0-0	3	2-1-2	27	3-2-3	290
1-0-1	7	2-1-3	34	3-3-0	240
1-0-2	1	2-2-0	21	3-3-1	460
1-0-3	1	2-2-1	28	3-3-2	1,100
1-1-0	7	2-2-2	35	3-3-3	>2,400
1-1-1	1				

ที่มา : คัดแปลงจาก AOAC (2005)

จากนั้นทำการวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อ *E. coli* โดยถ่ายเชื้อ 1 loop จากหลอด LST ที่มีฟองแก๊สลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth บ่มที่อุณหภูมิ 45.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อบ่มตามจำนวนเวลาแล้วสังเกตหลอดอาหาร EC broth ที่เกิดฟองแก๊ส เชื้อ 1 loop จากหลอด EC broth ที่เกิดแก๊ส เพื่อการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Levine's eosin methylene blue (EMB) agar หลังจากนั้นนำจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ประเมินค่า MPN ของ *E. coli* จากจำนวนหลอดของ EC broth ที่มีโคโลนีให้ผลเป็น +++ หรือ -+- เพื่อเก็บไปจัดจำแนกโดย Biochem test เลือกโคโลนีที่มีสีเขียวคล้ายปึกแมลงทับ (Metallic Sheen) บนผิวหน้าอาหาร EMB agar มา streak บนอาหาร PCA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (IMViC test) ดังนี้

1) การทดสอบ Indole โดยการถ่ายเชื้อจากอาหาร Plate Count Agar slant ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptophan broth แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย Kovac จำนวน 0.20-0.30 มิลลิลิตร ถ้าให้ผลบวกจะปรากฏสีแดงที่ส่วนบนของ Tryptophan broth

2) การทดสอบ Methyl red และ Acetoin (MR-VP) โดยการถ่ายเชื้อจากอาหารใน Plate Count Agar slant ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MR-VP บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วแบ่งเป็น 2 ส่วนดังนี้

2.1 ทดสอบ methyl red reaction (MR) โดยเติมสารละลาย methyl red 5 หยด ลงในสารละลายเชื้อโดยผลบวกจะให้สีแดง ผลลบจะให้สีเหลือง

2.2 ทดสอบ VP โดยถ่ายเชื้อ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติม 5% alcoholic-naphthol (w/v) ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร และ 40% KOH ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ผลบวกจะให้สีชมพูแดง

3) การทดสอบ Citrate ทำการถ่ายเชื้อใส่อาหาร Simmon's citrate agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ผลบวกจะให้สีน้ำเงิน จากนั้นทำการแปลผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 การจำแนกเชื้อ *E. coli* โดยวิธีทางชีวเคมี (IMViC test)

Type	Indole	MR	VP	Citrate
Typical <i>E. coli</i>	+	+	-	-
Atypical <i>E. coli</i>	-	+	-	-
Typical Intermediate	+	+	-	+
Atypical Intermediate	-	+	-	+
Typical <i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	+	+
Atypical <i>Enterobacter aerogenes</i>	+	-	+	+

ที่มา : ดัดแปลงจาก AOAC (2005)

3.6.3.6 การวิเคราะห์หา *E. coli* ในผลิตภัณฑ์ ตามวิธีของ AOAC (2006) โดยสุ่มตัวอย่างน้ำหนัก 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในสารละลาย กลีเซอรีนโคลไรด์ความเข้มข้น 0.85% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปตีปั่นด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 60 วินาที จากนั้นนำมาเจือจางจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นเปิดตัวอย่างและ dilution ที่เตรียมไว้จำนวน 0.1 มิลลิลิตร เพื่อการเพาะเลี้ยง เชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Chromocult agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดบนจานอาหารเพาะเชื้อ รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์เฉพาะจานอาหารเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30-300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g จากนั้นยืนยันผลโดยวิธีทางชีวเคมี

3.6.3.7 การวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อ *Salmonella* sp.

การวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อ *Salmonella* sp. ในผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแห้งพร้อมรับประทาน ตามวิธีของ AOAC (1995) สุ่มตัวอย่าง 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Tetrathionate broth (TTB) + Iodine solution และ Selenite cysteine broth (SCB) นำหลอดเพาะเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar และ *Salmonella*-*Shigella* (SS) agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีสีน้ำตาลเงินเขียว และตรงกลางมีสีดำ กลม นูน ผิวเรียบเป็นมัน อาจพบหรือไม่พบจุดตรงกลาง นำโคโลนีไปทำการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี โดยใช้เข็มเจาะเชื้อโคโลนีที่สงสัยไปเพาะลงในอาหาร Triple Sugar Iron (TSI) Agar slant และ Lysine-Indole-Motility (LIM) medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูผล

ปฏิกิริยาทางชีวเคมีในหลอด TSI agar slant และ LIM medium เชื้อ *Salmonella* sp. จะให้คุณสมบัติทางชีวเคมีดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 การตรวจผลของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยวิธีทางชีวเคมี

TSI				LIM		
Slant	Butt	H ₂ S	Gas	Lysine	Indole	Motile
K	A	+/-	+/-	+	-	+/-

K = การเกิด alkaline โดยบริเวณปลายหลอด (slant) ของอาหาร TSI จะมีสีชมพู บานเย็น-แดง

A = การเกิด Acid บริเวณก้นหลอด (butt) ของ TSI จะมีสีเหลือง

H₂S (+) = ภายในหลอดอาหาร TSI เกิดตะกอนสีดำของไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่ง *Salmonella* spp. ส่วนใหญ่จะให้ผล +

H₂S (-) = ภายในหลอดอาหาร TSI ไม่เกิดตะกอนสีดำของไฮโดรเจนซัลไฟด์

Gas (+) = มีฟองอากาศดันวุ้นของอาหาร TSI เนื่องจาก *Salmonella* spp. ส่วนใหญ่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสแล้วได้กรดและแก๊สเพียงเล็กน้อย

Gas (-) = ภายในหลอดอาหารไม่มีฟองอากาศดันวุ้นของ TSI

Lysine (+) = หลอดอาหารจะมีสีม่วงทั้งหลอดเนื่องจากเชื้อ *Salmonella* spp. มีเอนไซม์ Lysine decarboxylase ไปย่อย Lysine ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมีความเป็นด่างมากขึ้น มีผลทำให้ Brom cresol purple ซึ่งใช้เป็น Indicator ในอาหารดังกล่าวและมีค่าความเป็นกรดต่ำเป็นกลาง มีสีม่วงเข้มขึ้นซึ่ง *Salmonella* spp. จะมีเอนไซม์นี้

Lysine (-) = หลอดอาหารจะมีสีเหลืองเนื่องจากเชื้อ *Salmonella* spp. มีเอนไซม์ Lysine decarboxylase ไปย่อย Lysine ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมีความเป็นด่างต่ำมากขึ้น มีผลทำให้ Brom cresol purple เปลี่ยนเป็นสีเหลือง

Indole (+) = อาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสีแดงบนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อหลังหยดน้ำยา Kovac ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Indole (-) = อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เกิดสีแดงบนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อหลังหยดน้ำยา Kovac ซึ่ง *Salmonella* spp. ไม่มีเอนไซม์ tryptophanase จึงไม่เกิดปฏิกิริยากับ Kovac

Motile (+) = หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ LIM จะขุ่นทั้งหลอด ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *Salmonella* spp. ส่วนมากจะมีแฟลกเจลลาในการเคลื่อนที่ ดังนั้น เมื่อทำการ Stab เชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเกิดการเคลื่อนที่จากรอย Stab ไปทุกทิศทุกทางจึงทำให้หลอดขุ่น

Motile (-) = หลดอาหารเลี้ยงเชื้อ LIM จะมีการเจริญบริเวณรอย Stab เท่านั้น ส่วนบริเวณอาหารรอบรอย Stab จะใสทั้งนี้เนื่องจากเชื้อไม่มีแฟลกเจลลาในการเคลื่อนที่ เชื้อจึงเจริญบริเวณรอย Stab เท่านั้น

3.6.4 การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแห้งพร้อมรับประทาน

วิเคราะห์ทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแห้งพร้อมรับประทาน โดยการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสตามวิธีของ Meilgaard *et al.* (1987) โดยทดสอบ 7 ลักษณะ ได้แก่ ลักษณะปรากฏโดยรวม สี กลิ่น เนื้อสัมผัส รสชาติ ความหวาน และคุณภาพโดยรวม ประเมินโดยวิธี Consumer test และได้แนบตัวอย่างแบบประเมินความพึงพอใจต่อคุณภาพ ผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแห้งพร้อมรับประทาน โดยใช้ผู้ทดสอบชิมซึ่งเป็นกลุ่มนักศึกษา อาจารย์ และ ผู้บริโภคทั่วไปจำนวน 60 คนขึ้นไป โดยมีช่วงการให้คะแนนความพึงพอใจ 7 ระดับ (7 – Point Hedonic Scale) ตั้งแต่ 1 – 7 ดังต่อไปนี้

- 1 หมายถึง ไม่ชอบมากที่สุด
- 2 หมายถึง ไม่ชอบมาก
- 3 หมายถึง ไม่ชอบ
- 4 หมายถึง เฉยๆ
- 5 หมายถึง ชอบ
- 6 หมายถึง ชอบมาก
- 7 หมายถึง ชอบมากที่สุด

3.6.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์หมูหวานกึ่งแห้งพร้อมรับประทาน

หลังจากได้ผลิตภัณฑ์หมูหวานพร้อมรับประทานที่มีคุณภาพทางด้านการบริโภค (สี กลิ่น รสชาติ และลักษณะเนื้อสัมผัส) และมีความปลอดภัยทางด้านการบริโภค รวมทั้งมีความคงตัว ในระหว่างการเก็บรักษาที่เหมาะสมแล้วนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (proximate composition) โดยนำตัวอย่าง โปรตีน น้ำ ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ความชื้น และเถ้า ตามวิธีการของ (AOAC, 2005) ปริมาณคาร์โบไฮเดรต หาได้จากการคำนวณ = 100 - ผลรวมองค์ประกอบเคมี ทั้งหมด และประเมินค่าพลังงานจาก โปรตีน (x 4 kcal/g) ไขมัน (x 9 kcal/g) และคาร์โบไฮเดรต (x 4 kcal/g) ของผลิตภัณฑ์ที่หาได้จากกระบวนการที่กล่าวมาข้างต้น วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงพรรณนา แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD

3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design, CRD) ยกเว้นการวิเคราะห์ทางด้านประสาทสัมผัส ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มไม่สมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design, RCBD) นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์หาความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป (SPSS for windows version 11.5 : SPSS Inc.)