บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

วัตถุดิบ

1. เนื้อมะพร้าวแก่จัดกะเทาะเปลือก จากตลาดหนองชาก อ. บ้านบึง จ. ชลบุรี
2. เนื้อปลาทูแล่ จากท่าเรือบางแสน ต. แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี
3. เกลือ ตราปรุงทิพย์
4. พริกไทยขาว ตรามือ
5. แป้งเทมปุระ ตรา Mc Garrett
6. ไข่ไก่ ตรา CP

สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH, AR Grade Ajax Finechem, ออสเตรเลีย)
2. ไฮโดรคลอลิก (HCl, AR Grade Merck Darmstadt, ประเทศเยอรมนี)
3. เอทธานอล 95% (ethanol, AR Grade Ajax Finechem, ออสเตรเลีย)
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl, AR Grade Ajax Finechem, ออสเตรเลีย)
5. โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI, AR Grade Ajax Finechem, ออสเตรเลีย)
6. โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$, AR Grade Merck Darmstadt, เยอรมนี)
7. ไดเอทิลอีเทอร์ ($C_4H_{10}O$, AR Grade Fisher, สหราชอาณาจักร)
8. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH, AR Grade Ajax Finechem, ออสเตรเลีย)
9. พีนอฟทาลีน (AR Grade Merck Darmstadt, เยอรมนี)
10. ไอโอดีน (I_2, AR Grade Fuka, สวิสเซอร์แลนด์)
11. กรดอะซิตริก (AR Grade Fisher, สหราชอาณาจักร)
12. คลอโรฟอร์ม (AR Grade Fisher, สหราชอาณาจักร)
13. DMSO (AR Grade Fuka, สวิสเซอร์แลนด์)
14. ยาปฏิชีวนะ (Tetracycline) (Oxoid, สหราชอาณาจักร)
15. โพแทสเซียม เทลลูไรท์ (potassium tellurite, Hi-media, อินเดีย)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Lactobacillus plantarum*
2. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
3. *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311
4. *Escherichia coli* ATCC 8739
5. *Bacillus cereus* ATCC 11778
6. *Bacillus subtilis* ATCC 6633
7. *Vibrio paraheamolyticus* ATCC 17802

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Mueller-Hinton Agar (MHA, Difco, สหรัฐอเมริกา)
2. Tryptic soy broth (TSB, Difco, สหรัฐอเมริกา)
3. Nutrient agar (NA, Oxoid, สหราชอาณาจักร)
4. Plate count agar (PCA, Hi-Media, อินเดีย)
5. Mueller Hinton Agar (MHA, Difco, สหรัฐอเมริกา)
6. Baird Parker Egg Yolk Tellurite Agar (BPEY, Difco, สหรัฐอเมริกา)
7. Brain heart infusion (BHI, Merck Darmstadt, ประเทศเยอรมนี)
8. Thiosulfate Citrate Bile Salt (TCBS, Difco, สหรัฐอเมริกา)
9. Mannitol Egg Yolk Phenol Red Polymyxin Agar (MYP, Difco, สหรัฐอเมริกา)
10. Peptone (Hi-media, อินเดีย)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดละเอียด (Sartorius รุ่น AC 211S, เยอรมนี)
2. เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดหยาบ (Sartorius รุ่น BA 610, เยอรมนี)
3. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator, Memmert รุ่น BE 600, สหรัฐอเมริกา)
4. เครื่องตีบด (Stomacher)
5. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar Flow Cabinet, รุ่น Bio-Klone 2 Series II Type A2, แคนนาดา)
6. เครื่องวัดความหนืด (Brookfield Viscometer รุ่น DV-III Ultra Rheometer, สหรัฐอเมริกา)
7. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven, Shel Lab รุ่น 1350FX, สหรัฐอเมริกา)
8. Mini Spray dryer (Büchi, B-190,สวิตเซอร์แลนด์)
9. เครื่องบีบอัดแบบไฮโดรลิก (SAKAYA รุ่น A-2, ไทย)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

10. ตะเกียงแอลกอฮอร์
11. pH meter
12. Hot plate
13. เครื่องขูดมะพร้าว
14. Micropipette และ Tip
15. Sterile cotton swab
16. Spreader
17. Loop
18. แผ่นดิสก์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
19. กระดาษกรอง Whatman No. 5
20. โถแก้วทรงสูง
21. เครื่องแก้ว
22. อุปกรณ์งานครัว

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสกัดน้ำมันมะพร้าวและกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าว

1.1. การสกัดน้ำมันมะพร้าว

1.1.1. การสกัดน้ำมันมะพร้าวโดยใช้ความร้อน (Hot Press Extraction) จากน้ำกะทิ

โดยนำเนื้อมะพร้าวที่ผ่านการบดด้วยเครื่องขูดมะพร้าวมาทำการบีบอัดโดยใช้เครื่องบีบอัดแบบไฮโดรลิก รุ่น SAKAYA A-2 ทำการบีบอัดสองครั้ง ครั้งแรกบีบอัดโดยไม่ใช้น้ำจะได้ส่วนของหัวกะทิ จากนั้นทำการบีบอัดอีกครั้งโดยใช้น้ำ 60 องศาเซลเซียส ในอัตรา 1 ต่อ 1 จะได้ส่วนของหางกะทิ จากนั้นนำน้ำกะทิแช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการแยกส่วนที่จับตัวกันออกมา ให้ความร้อนด้วยเตาแก๊สไฟปานกลาง อุณหภูมิของกะทิอยู่ที่ 90 ถึง 105 องศาเซลเซียส คนทุก ๆ 3 ถึง 5 นาทีเพื่อป้องกันการไหม้บริเวณด้านล่างของภาชนะ เมื่อระเหยน้ำไปจนหมดแล้ว (สังเกตจากไอน้ำที่ระเหยออกมาน้อยลง) อุณหภูมิจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนอยู่ที่ประมาณ 120 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที จากนั้นลดไฟให้อยู่ในระดับอ่อนอุณหภูมิของกะทิจะอยู่ที่ 115 ถึง 125 องศาเซลเซียส และทำการคนตลอดเวลา เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง หรือจนกว่ากากของกะทิจะมีสีเหลืองทอง จากนั้นตักน้ำมันและกากขึ้นกรองด้วยผ้าขาวบางที่แห้งสนิท 4 ชั้น แล้วเก็บน้ำมันในภาชนะที่ปิดสนิท

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.1.2. การสกัดน้ำมันมะพร้าวโดยวิธีทางชีวภาพ (Biological Extraction) จากน้ำกะทิโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ *L. plantarum* (ชุติมา สัมมา และสุภาพร สมร, 2552: Che Man, Abdul Karim, & Teng, 1997)

นำเนื้อมะพร้าวที่ผ่านการบดด้วยเครื่องขูดมะพร้าวมาทำการบีบอัดโดยใช้เครื่องบีบอัดแบบไฮโดรลิก รุ่น SAKAYA A-2 ทำการบีบอัดสองครั้ง ครั้งแรกบีบอัดโดยไม่ใช้น้ำจะได้ส่วนของหัวกะทิ จากนั้นทำการบีบอัดอีกครั้งโดยใช้น้ำ 60 องศาเซลเซียส ในอัตรา 1 ต่อ 1 จะได้ส่วนของหางกะทิ นำส่วนของหัวกะทิและส่วนของหางกะทิใส่ลงในโถแก้วทรงสูง จากนั้นเติมน้ำสะอาดอีก 0.25 เท่าของน้ำกะทิ หรือให้น้ำกะทิอยู่ในระดับ 4 ใน 5 ส่วนของภาชนะ ทำการเติมเชื้อ *L. plantarum* เข้มข้น 1.5×10^{6} cfu/ml ร้อยละ 3 ของปริมาณน้ำกะทิทั้งหมด คนให้เข้ากัน ปิดภาชนะให้สนิทและทิ้งไว้เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง (ขึ้นกับสภาพอากาศ โดยสังเกตการแยกชั้นของน้ำมัน) แยกน้ำมันที่อยู่ส่วนบนออก จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง 8 ชั้น นำน้ำมันที่ได้มาพักไว้ให้ส่วนที่เป็นน้ำปนมาตกลงข้างล่างแล้วแยกส่วนที่เป็นน้ำออกจากส่วนที่เป็นน้ำมัน นำส่วนของน้ำมันมากรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No. 5 เพื่อกรองผลึกไขมันและสิ่งปลอมปนออก จะได้น้ำมันที่ใสขึ้น แล้วเก็บในภาชนะปิดสนิท
วิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพของน้ำมันมะพร้าวดังนี้ (ภาคผนวก ก)

- ความหนืด ด้วยเครื่อง Brookfield Viscometer รุ่น DV-III (Rheometer)
- ความหนาแน่นสัมพัทธ์ (Relative Density) (AOAC, 2005)
- ความชื้นและสารระเหยได้ที่ 105 องศาเซลเซียส (Water and Volatile Materials at 105 ° C) (AOAC,2005)
- ค่าเปอร์ออกไซด์ (Peroxide Value) (AOAC, 2005)
- ค่า Acid Value (AOAC, 2005)
- ค่า Iodine Number I.N. (AOAC, 2005)
- ค่าสปอนนิฟาย (Saponification Number) (AOAC, 2005)
- คาไทโอบารบิทิวริคนัมเบอร (TBA Number) (AOAC,1995)
- วิเคราะห์ปริมาณและชนิดของกรดไขมันในน้ำมันมะพร้าว (AOAC, 2005) ด้วย Gas Chromatography

1.2. การเตรียมกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวสกัดโดยความร้อนและน้ำมันมะพร้าวสกัดโดยวิธีทางชีวภาพ (ดัดแปลงจาก ปิยวรรณ กฤชเศรษฐสกุล, 2548)

นำน้ำมันมะพร้าว 350 กรัม โซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 กรัม และน้ำ 1200 กรัม ให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส กวนในอัตรา 750 rpm จนสารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมกรด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ไฮโดรคลอลิกเข้มข้นประมาณ 250 กรัม ทำการกวนในอัตรา 750 rpm เป็นเวลา 2 ชั่วโมงหรือจนกว่าสารจะแยกชั้น โดยที่สารที่แยกชั้นจะมีลักษณะเป็นของเหลวใสลอยอยู่บริเวณผิวหน้าของสารละลาย แยกสารที่อยู่ด้านบนออกใส่ลงในกรวยแยกสาร ล้างด้วยน้ำกลั่นจนแน่ใจว่าไม่มีกรดไฮโดรคลอลิกหรือเกลือหลงเหลือ ตรวจสอบด้วยกระดาษวัดค่า pH โดยค่า pH จะเท่ากับน้ำกลั่นที่นำมาล้าง จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาระเหยน้ำออกด้วยความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และเก็บไว้ในภาชนะปิดสนิท วิเคราะห์ปริมาณและชนิดของกรดไขมันที่สกัดได้ (AOAC, 2005)

2. การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันมะพร้าวและกรดไขมันเตรียมจากน้ำมันมะพร้าวในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค

2.1. ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันมะพร้าว และกรดไขมันเตรียมจากน้ำมันมะพร้าว ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ด้วยวิธี Disc Diffusion (Collins, Lyne, Grange, & Falkinham, 2004)

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *S. aureus*, *S.* Typhimurium, *E. coli*, *B. cereus*, *B. subtilis* ในอาหาร NA และ *V. paraheamolyticus* ใน NA ที่มีเกลือ 2% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียทดสอบ 4-5 โคโลนี ใส่ลงใน Tryotic Soy Broth ยกเว้น *V. paraheamolyticus* ซึ่งต้องใส่ลงใน Tryotic Soy Broth ที่มีเกลือ 2% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ถึง 4 ชั่วโมง ทำการปรับปริมาณเชื้อด้วยโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.85% ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland Standard No. 0.5 ซึ่งมีเชื้อประมาณ $1.5x10^8$ cfu/ml นำ Sterile Cotton Swab จุ่มเชื้อที่ปรับปริมาณแล้ว บิดกับข้างหลอดให้พอหมาด จากนั้นป้ายบริเวณผิวหน้าของ MHA ให้ทั่วผิวหน้า โดยป้ายในแนวระนาบ 3 ระนาบ พักไว้ 3 ถึง 5 นาที ทำการวางดิสก์ซึ่งบรรจุสารทดสอบ 4 ชนิด ได้แก่ น้ำมันมะพร้าวสกัดโดยความร้อน น้ำมันมะพร้าวสกัดโดยวิธีทางชีวภาพ กรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวสกัดโดยความร้อน และโดยวิธีทางชีวภาพ (ความเข้มข้น 50% v/v) ประมาณ 20 ไมโครลิตร/ดิสก์ และวางดิสก์บรรจุยาปฏิชีวนะ Tetracycline (30 ไมโครกรัม/ ดิสก์) เป็น Positive Control และดิสก์ที่บรรจุตัวทำละลาย (DMSO) (20 ไมโครลิตร/ ดิสก์) เป็น Negative Control บนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง ทำการอ่านผลโดยตรวจวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition Zone (ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.2 หาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ต่อแบคทีเรียทดสอบ โดย Agar Dilution Method (Collins, Lyne, Grange, & Falkinham, 2004)

ทำการเจือจางสารทดสอบโดยวิธี Two-Fold Dilution ด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.2 และ 0.1 %v/v ตามลำดับ จากนั้นนำสารทดสอบแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสม MHA หลอมเหลว (อุณหภูมิ 50 ถึง 55 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 19 มิลลิลิตร แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดไขมันตั้งแต่ 5 ถึง 0.005 %v/v ส่วนชุดควบคุมทำเช่นเดียวกันแต่เปลี่ยนจากการเติมสารทดสอบเป็นยาปฏิชีวนะ Tetracycline และ DMSO จากนั้นนำแบคทีเรียทดสอบที่ผ่านการปรับความเข้มข้นด้วยโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.85 % ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland Stadard No. 0.5 (วิธีดังข้อ 2.1.) ซึ่งมีปริมาณเชื้อประมาณ 1.5×10^8 cfu/ml มาทำการเจือจางด้วยสารละลาย NaCl 0.85 % ให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^6 cfu/ml ทำการหยดเชื้อแต่ละชนิดลงบนอาหาร MHA ที่เตรียมไว้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร/หยด จากนั้นรอจนกระทั่งหน้าอาหารแห้ง จึงนำเข้าบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง อ่านผลค่า MIC ของแบคทีเรียที่ทำการทดสอบและทำการหาค่า MIC ของ tetracycline ต่อ *S. aureus* ATCC 25923 เพื่อควบคุมคุณภาพการทดลอง (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของกรดไขมันที่เตรียมจากน้ำมันมะพร้าวในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในเนื้อปลาชุบแป้งทอดกึ่งสุก

3.1. เตรียมตัวอย่างอาหารที่แบคทีเรียทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่ถูกยับยั้งด้วยสารทดสอบจากข้อ 2.2 ใส่ลงบนเนื้อปลาทูแล่ปรุงรสกึ่งสุก (ปรุงรสด้วยเกลือ 2% และพริกไทย 0.1% จากนั้นนำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที) โดยให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^5 ถึง 10^6 cfu/กรัม จากนั้นเติมสารทดสอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียความเข้มข้น 10 เท่า (0.39 %v/w) และ 20 เท่า (0.78 %v/w) ของค่า MIC (พิชัญญา ชาญชัย, 2551) ลงไปบนเนื้อปลา ชุดควบคุมในขั้นตอนนี้ได้แก่ ตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อแต่ไม่เติมสารทดสอบ และตัวอย่างที่ไม่มีการเติมเชื้อและไม่มีการเติมสารทดสอบ จากนั้นนำตัวอย่างมาคลุกกับแป้งเทมปุระประมาณ 1.5 กรัม (น้ำหนักสุดท้ายประมาณ 12.5 กรัม) แบ่งใส่ถุง ถุงละ 2 ชิ้น แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –10 องศาเซลเซียส

3.2. วิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทดสอบในตัวอย่างอาหาร

3.2.1 ปริมาณ *Staphylococcus aureus* (ดัดแปลงจาก Bennett & Lancette, 2001)

นำอาหารตัวอย่าง 25 กรัมใส่ลงในถุงตีบด (Stomacher Bag) ที่มีสารละลายเปปโตน 225 มิลลิลิตรผสมอยู่ นำไปตีบดด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลาอย่างน้อย 30 วินาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 10^{-1} ทำการเจือจางโดยนำสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน

หลอดบรรจุสารละลายเปปโตน 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมจะได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-2} แล้วทำการเจือจางต่อไปด้วยสารละลายเปปโตน ให้ได้ระดับความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} เลือกระดับความเจือจางที่เหมาะสมมา 3 ระดับจากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายแต่ละระดับความเจือจางใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BPEY จำนวน 3จาน จานละ 0.3, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตร จากนั้นใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 35องศาเซลเซียส 45-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *S. aureus* ซึ่งมีลักษณะ สีดำ กลมนูน เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 2 ถึง 3 มิลลิเมตร มีวงแหวนขาวขุ่นล้อมรอบ ซึ่งมีวงแหวนใส ๆ ล้อมรอบอีกชั้นหนึ่ง และเลือกโคโลนีที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จำนวน 5 % ของโคโลนีบนจานเพาะเชื้อของระดับความเจือจางที่มีโคโลนี 20 ถึง 200 โคโลนี มาทำการย้อมสีแกรม ดูลักษณะของเซลล์ และ Coagulase test (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

3.2.2. ปริมาณ *Bacillus subtilis* (ดัดแปลงจาก Tallent, Rhodehamel, Harmon, & Bennett, 2001)

นำอาหารตัวอย่าง 25 กรัมใส่ลงในถุงตีบด (Stomacher Bag) ที่มีสารละลายเปปโตน 225 มิลลิลิตรผสมอยู่ นำไปตีบดด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลาอย่างน้อย 30 วินาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 10^{-1} ทำการเจือจางโดยนำสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด บรรจุสารละลายเปปโตน 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมจะได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-2} แล้วทำการเจือจางต่อไปด้วยสารละลายเปปโตน ให้ได้ระดับความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} เลือกระดับความเจือจางที่เหมาะสมมา 3 ระดับจากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายแต่ละระดับความเจือจางใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP จำนวน 3 จาน จานละ 0.3, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตร จากนั้นใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้านำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีมีลักษณะจำเพาะของ *B. subtilis* ซึ่งมีลักษณะกลม แบน ผิวหน้าด้าน สีเหลืองนวล อาจมีการสร้างไบโอฟิล์มบริเวณด้านบนโคโลนี เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลือง และเลือกโคโลนีที่คาดว่าเป็น *B. subtilis* จำนวน 5 % ของโคโลนี บนจานเพาะเชื้อของระดับความเจือจางที่มีโคโลนี 20 ถึง 200 โคโลนี มาทำการย้อมสีแกรม ดูลักษณะของเซลล์ และทดสอบการเจริญแบบไรซอยด์ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

3.2.3. ปริมาณ *Bacillus cereus* (ดัดแปลงจาก Tallent, Rhodehamel, Harmon, & Bennett, 2001)

นำอาหารตัวอย่าง 25 กรัมใส่ลงในถุงตีบด (Stomacher Bag) ที่มีสารละลาย

เปปโตน 225 มิลลิลิตรผสมอยู่ นำไปตีบดด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลาอย่างน้อย 30 วินาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 10^{-1} ทำการเจือจางโดยนำสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดบรรจุสารละลายเปปโตน 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมจะได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-2} แล้วทำการเจือจางต่อไปด้วยสารละลายเปปโตน ให้ได้ระดับความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} เลือกระดับความเจือจางที่เหมาะสมมา 3 ระดับจากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายแต่ละระดับความเจือจางใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP จำนวน 3 จาน จานละ 0.3, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตร จากนั้นใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้านำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ถึง 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีมีลักษณะจำเพาะของ *B. cereus* ซึ่งมีลักษณะโคโลนีขนาดใหญ่ ขอบไม่เรียบ สีเหลืองนวลหรือสีชมพู เกิดวงรอบสีชมพู และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีชมพู ทำการคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าเป็น *B. cereus* จำนวน 5 % ของโคโลนี บนจานเพาะเชื้อของระดับความเจือจางที่มีโคโลนี 20 ถึง 200 โคโลนี มาทำการย้อมสีแกรม ดูลักษณะของเซลล์และทดสอบการเจริญแบบไรซอยด์ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

3.2.4. ปริมาณ *V. parahaemolyticus* (ดัดแปลงจาก Maturin & Peeler, 2001; Kaysner & Depaola, 2004)

นำอาหารตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ลงในถุงตีบด (Stomacher Bag) ที่มีสารละลายเปปโตน 225 มิลลิลิตรผสมอยู่ นำไปตีบดด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลาอย่างน้อย 30 วินาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 10^{-1} ทำการเจือจางโดยนำสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดบรรจุสารละลายเปปโตน 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมจะได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-2} แล้วทำการเจือจางต่อไปด้วยสารละลายเปปโตนให้ได้ระดับความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} เลือกระดับความเจือจางที่เหมาะสมมา 3 ระดับจากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายแต่ละระดับความเจือจางใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่มีเกลือ 2 % จำนวน 3 จาน จานละ 0.3, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตร จากนั้นใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้านำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ถึง 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีมีลักษณะจำเพาะของ *V. parahaemolyticus* ซึ่งมีลักษณะใส กลม นูน มันวาว ขอบเรียบ ทำการเลือกโคโลนีที่คาดว่าเป็น *V. parahaemolyticus* จำนวน 5 % ของโคโลนี บนจานเพาะเชื้อของระดับความเจือจางที่มีโคโลนี 20 ถึง 200 โคโลนี มาทำการย้อมสีแกรม ดูลักษณะของเซลล์และทดสอบการทนเกลือ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.3. คำนวณปริมาณเชื้อและเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางสถิติ
โดยคำนวณ cfu/g ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดในตัวอย่างอาหารดังนี้

โดย cfu/g = (b x n) / (a x d)

ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนี ลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียแต่ละชนิด
a = จำนวนโคโลนีที่นำมาทดสอบ
b = จำนวนโคโลนีที่ให้ผลการทดสอบของแบคทีเรียแต่ละชนิด
d = ความเจือจางของตัวอย่าง

รายงานผลในรูปจำนวนโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม (cfu/g) จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้จากการคำนวณวิเคราะห์ความแปรปรวน ตามแผนการทดลอง Completely Randomized Design (CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อทำการคัดเลือกความเข้มข้นและชนิดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดมาทำการทดลองต่อไป

4. การทดสอบทางประสาทสัมผัส

เตรียมเนื้อปลาชุบแป้งทอดกึ่งสุกเพื่อนำไปทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยนำเนื้อปลาทูแล่ ปรุงรสด้วยเกลือ 2 % และพริกไทย 0.1 % จากนั้นนำไปนึ่งสุกที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ในปริมาณที่ให้ผลการทดสอบที่ดีที่สุดในข้อ 3 ลงไปในเนื้อปลา โดยมีชุดควบคุม คือตัวอย่างที่ไม่เติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ จากนั้นนำมาคลุกกับแป้งเทมปุระประมาณ 1.5 กรัม (น้ำหนักสุดท้ายประมาณ 12.5 กรัม) แบ่งใส่ถุง ถุงละ 2 ชิ้น แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ – 10 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 และ 28 วัน

ทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีวิเคราะห์ลักษณะทางประสาทสัมผัสแบบพรรณนาเชิงปริมาณ (Quantitative Descriptive Analysis ; QDA) (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2545) ที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยนำเนื้อปลาชุบแป้งที่ทำการเก็บที่ระยะเวลาต่างๆ มาทอดที่อุณหภูมิ 170 $\pm$ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ถึง 5 นาที ใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 6 คน นำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) ตามแผนการทดลอง CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประเมินความชอบของผู้บริโภคด้วยวิธี 9 Point Hedonic Scaling (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2545) โดยใช้ผู้ทดสอบ 30 คน ทำการทดสอบคุณลักษณะด้านลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส สี และกลิ่นของผลิตภัณฑ์เนื้อปลาชุบแป้งที่ผ่านการทอด นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนตามแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

วิเคราะห์คาไทโอบารบิทิวริคนัมเบอร์ (TBA Number) เป็นคาดัชนีบอกถึงการเกิดกลิ่นหืน (AOAC, 2000) ทำการทดสอบที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 และ 28 วันควบคู่กับการทดสอบทางประสาทสัมผัส

5. การเอนแคปซูเลชันกรดไขมัน

การเอนแคปซูเลชันกรดไขมัน (Fuchs et al., 2006) โดยสารเคลือบที่ใช้ในการทดลองได้แก่ Lactose 5.88 % และ Sodium Caseinate 5.88 % ต่อปริมาณสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 5.88 % (จะได้สารเคลือบปริมาณต่อปริมาณสารยับยั้งจุลินทรีย์เท่ากับ 2:1) จากนั้นเติมน้ำ 82.36 % ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เป็นอิมัลชันด้วยเครื่อง Polytron (PT 3100, Kinematica) ระดับความเร็วที่ 1500 rpm เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำสารอิมัลชันมาทำแห้งด้วยเครื่อง Büchi 190 Mini Spray Dryer โดยใช้ความเร็วของปั๊มที่ประมาณ 300 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ความเร็วลม 5 Bar อุณหภูมิ Inlet 135 ถึง 145 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ Outlet 83 ถึง 88 องศาเซลเซียส เมื่อได้ผลิตภัณฑ์ออกมาในลักษณะผงละเอียด เก็บใส่ภาชนะให้มิดชิดเพื่อป้องกันความชื้นและนำไปทำการวิเคราะห์ต่อไป

ถ่ายฉาพสารละลายอิมัลชันก่อนเข้าสู่กระบวนการทำแห้งและผลิตภัณฑ์หลังจากการทำแห้งด้วย Light Microscope (Olympus BX60) ที่กำลังขยาย 20 เท่า

วิเคราะห์ร้อยละการกักเก็บสารยับยั้งจุลินทรีย์ (Microencapsulation Effiency (MEE)) (Socrates, Marleny, & Feral, 2011) เพื่อให้ทราบค่าปริมาณสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารเคลือบหลังจากนำสารละลายทำแห้งด้วย Spray Dryer โดยค่า MEE สามารถคำนวณได้จาก

$$MEE = \frac{(\text{Total Oil} - \text{Surface Oil})}{\text{Total Oil}} \times 100$$

โดยที่

- Total Oil คือ ปริมาณสารยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ วิเคราะห์ได้จากนำผลิตภัณฑ์ที่ผ่าน Encapsulation 500 มิลลิกรัม ไปสกัดโดยเติม Ethanol 85 % ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อละลายตัวอย่าง ทำการกวนเบา ๆ 15 นาที จากนั้นค่อย ๆ เติม Petroleum Ether 5 ครั้ง ครั้งละ 5

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

มิลลิลิตร (ปริมาณ Petroleum Ether ทั้งหมด 25 มิลลิลิตร) ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แยกสารที่อยู่ด้านบนออกมา แล้วนำสารที่เหลือจากการสกัดไปทำการสกัดเช่นเดิม 3 ครั้ง นำสารที่แยกออกมาไปทำการระเหยโดยใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อตัวทำละลายระเหยจนหมด จะเหลือส่วนที่เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ ทำการชั่งน้ำหนักเพื่อนำไปคำนวณต่อไป

- Surface Oil คือ ปริมาณสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณพื้นผิวของผลิตภัณฑ์ ซึ่งสารที่เคลือบไม่ได้เคลือบอย่างสมบูรณ์ วิเคราะห์ได้จากนำสารที่ผ่านเอนแคปซูเลชั่น 500 มิลลิกรัม ใส่ลงในกระดาษกรอง (Whatman No. 41) ที่พับเป็นรูปกรวย ทำการล้างสารด้วย Petroleum Ether 1 มิลลิลิตร ทั้งหมด 5 ครั้ง (ปริมาณ Petroleum Ether ทั้งหมด 5 มิลลิลิตร) นำสารละลายที่ได้จากการล้างไปทำการระเหยโดยใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อตัวทำละลายระเหยจนหมด จะเหลือส่วนที่เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ ทำการชั่งน้ำหนักเพื่อนำไปคำนวณต่อไป

ทดสอบประสิทธิภาพของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผ่านเอนแคปซูเลชั่น โดยการวิเคราะห์ Minimum Inhibitory Concentration (MIC) โดยวิธี Agar Dilution Method (Collins, Lyne, Grange, & Falkinham, 2004) เพื่อทำการเปรียบเทียบกับผลการทดลองในข้อ 2.2 กับสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ผ่านเอนแคปซูเลชั่น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University