

บทที่ 3

วิธีทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการยืดอายุการเก็บน้ำพริกแกง โดยน้ำพริกแกงที่ใช้ในการทดลองนั้น บดด้วยเครื่องจักรของทางโรงงานผู้ผลิตรายหนึ่งในจังหวัดสมุทรปราการ ซึ่งมีการผลิตทางการค้า อยู่ในปัจจุบัน และตัวอย่างวัตถุดิบทุกชนิดที่ตรวจนี้ สุ่มมาจากทางโรงงานผู้ผลิตรายนี้

3.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี จุลชีววิทยา และทางประสาทสัมผัสของ น้ำพริกแกง และ วิเคราะห์แบคทีเรียที่พบในน้ำพริกแกงที่เริ่มเสีย

ในขั้นต้นเป็นการเตรียมตัวอย่างเครื่องเทศด้วยการนำเครื่องเทศที่เป็นองค์ประกอบหลัก ของน้ำพริกแกงทำความสะอาดและตัดแต่ง โดยตัดขั้วพริกชี้ฟ้าแห้งและผ่าครึ่งตามแนวยาวของ ผล หอมแดงตัดรากและลอกเปลือกออก กระเทียมแยกเปลือกที่ร่อนออก และตะไคร้ตัดส่วนใบ และรากออก ทำการล้างตัวอย่างทั้งหมด 1 ครั้ง ด้วยน้ำประปา โดยแยกล้างที่ละตัวอย่างนำขึ้น แล้วสะเด็ดน้ำ ยกเว้นพริกชี้ฟ้าแห้ง รากผักชีและกระเทียม โดยนำพริกชี้ฟ้าแห้งที่ตัดแต่งเรียบร้อยแล้ว ล้างน้ำแล้วนำขึ้นสะเด็ดน้ำ รากผักชีแช่น้ำไว้ 15 นาทีก่อนล้างด้วยน้ำประปา 2-3 ครั้ง ส่วน กระเทียมไม่ล้างน้ำ จากนั้นปอกผิวมะกรูด สำหรับการเตรียมเป็นน้ำพริกแกง และใช้ตรวจคุณภาพ ทางจุลินทรีย์ต่อไป

3.1.1 การตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ของวัตถุดิบ

ตรวจปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด *C. perfringens* *E.coli* *Salmonella* sp. *S. aureus* (ภาคผนวก ข.1-ข.5) ในเครื่องเทศที่เตรียมจากข้อ 3.1.1 และวัตถุดิบอื่นๆ ที่ใช้เป็น ส่วนผสมในน้ำพริกแกงเผ็ดและน้ำพริกแกงส้ม ได้แก่ ลูกผักชี ผิวมะกรูด รากผักชี กะปิ ยี่หระ และ เมล็ดพริกไทย

3.1.2 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของน้ำพริกแกงในระหว่างการเก็บที่ อุณหภูมิห้อง

นำเครื่องเทศที่จากข้างต้นมาเตรียมน้ำพริกแกงเผ็ดและน้ำพริกแกงส้มที่มีสูตร ดังนี้ (ดัดแปลงจาก ศรีสมร คงพันธุ์, 2543)

น้ำพริกแกงส้ม

หอมแดง	56 %
กระเทียม	20 %
พริกชี้ฟ้าแห้ง	12 %
กะปิ	6 %
เกลือ	6%

น้ำพริกแกงเผ็ด

กระเทียม	40 %
หอมแดง	24 %
ตะไคร้	9.6%
พริกชี้ฟ้าแห้ง	8 %
ลูกผักชี	5.6%
ผิวมะกรูด	2.4%
รากผักชี	2.4%
กะปิ	2.4%
เกลือ	2.4%
ยี่หระ	1.6%
เมล็ดพริกไทย	1.6%

นำวัตถุดิบที่เตรียมได้จากข้างต้นบดด้วยเครื่องบดน้ำพริกแกงแบบหินบด เก็บ 2 สภาวะ ได้แก่ สภาวะบรรจุแบบมีอากาศ บรรจุน้ำพริกแกงชนิดละ 100 กรัมใส่ถุง PET/L/vmPET/DT/L-LDPE หนา 50 ไมครอน ขนาด 100 mm X 130 mm แล้ววัดด้วยหนังยาง โดยให้มีสัดส่วนอากาศต่อปริมาตรบรรจุเท่ากับ 10:1 และ สภาวะบรรจุแบบสุญญากาศ บรรจุ น้ำพริกแกงชนิดละ 100 กรัมใส่ถุง PET/Al/Ny/ CPP หนา 136 ไมครอน ขนาด 100 mm x 130 mm และปิดผนึกสุญญากาศ ด้วยเครื่อง WEBOMATIC รุ่น EASY PACK 05LC4599 ด้วยความดัน 1.0 บาร์ เก็บที่อุณหภูมิห้อง สุ่มตัวอย่างน้ำพริกแกงแต่ละชนิดมาทดสอบสภาวะละ 1 ถุง มา ประเมิน ตรวจ และวัด ดังนี้

- ประเมินด้านกลิ่นและสีทางประสาทสัมผัส โดยวิธี qualitative descriptive analysis with scoring test ด้วยแบบทดสอบ (ภาคผนวก ค.1) ใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝน 15 คน

ทำ 2 ซ้ำ ทดสอบวันที่ 0 และทุกวันกระทั่งครบ 1 สัปดาห์หรือจนกว่าจะเสียชีวิต (เกณฑ์การเสียชีวิต คือ คะแนนเฉลี่ยต่ำกว่า 5 จากคะแนนเต็ม 9)

- ตรวจปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (ภาคผนวก ข.1) ฤๅละ 2 ซ้ำ
- วัดค่า a_w ด้วยเครื่อง NOVASINA AW SPRINT (TH500) (ภาคผนวก ก.1) ฤๅละ 2 ซ้ำ
- วัดค่า pH ด้วยเครื่อง Cyberscan1000 (RS232 meter) (ภาคผนวก ก.2) ฤๅละ 2 ซ้ำ
- วัดค่าสีด้วยเครื่อง Minolta Chroma Meter รุ่น CR300 Series (ภาคผนวก ก.3) ฤๅละ 2 ซ้ำ

โดยตรวจและวัด ในวันที่ 0 และทุกวันกระทั่งครบ 1 สัปดาห์หรือจนกว่าจะเสียชีวิตจากการประเมินด้านกลิ่นหรือสีทางประสาทสัมผัส

3.1.3 การตรวจชนิดและปริมาณแบคทีเรียที่พบในน้ำพริกแกงที่เริ่มเสียชีวิต

นำน้ำพริกแกงเผ็ด และน้ำพริกแกงส้มที่เริ่มเสียชีวิตมาแยกจุลินทรีย์ (ภาคผนวก ข.7) ปริมาณมากที่สุดที่พบ และนำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อระบุชนิดของเชื้อที่พบ (Holt, 1994)

3.2 ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของน้ำพริกแกงที่มีต่อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด และต่อแบคทีเรียที่พบในน้ำพริกแกงที่เริ่มเสียชีวิต

3.2.1 การศึกษาปริมาณรังสีที่ทำให้น้ำพริกแกงปลอดจุลินทรีย์

นำน้ำพริกแกงเผ็ด และน้ำพริกแกงส้มที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.2 บรรจุในถุง Stomacher ฤๅละ 25 กรัม ปิดผนึกสุญญากาศ นำไปฉายรังสีที่สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ ด้วยเครื่องปฏิกรณ์รังสีแกมมาซึ่งมีแหล่งพลังงานเป็น Cobalt-60 ฉายรังสีที่ระดับ 5 10 15 และ 20 กิโลเกรย์ แล้วนำมาตรวจปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (ภาคผนวก ข.1) เพื่อให้ได้ข้อมูลระดับรังสีที่ทำให้น้ำพริกแกงปลอดเชื้อ

3.2.2 วิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งของน้ำพริกแกงที่มีผลต่อแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรีย ที่พบในน้ำพริกแกงที่เริ่มเสียชีวิต

นำแบคทีเรียก่อโรค ตามเกณฑ์ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2544) ได้แก่ *C. perfringens* (ได้รับอนุเคราะห์มาจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) *E.coli* *Salmonella* sp. และ *S. aureus* ซึ่งนำมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

ไทย ตลอดจนแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำพริกแกงที่เริ่มเสีย ได้แก่ *B. circulans* และ *B. licheniformis* ซึ่งแบคทีเรียทั้งหมดจะอยู่ในรูปของสารละลายน้ำเกลือ 0.85% ที่มีปริมาณเชื้อประมาณ $6 - 7 \log \text{ CFU/ml}$ นำมาเติม 1 มิลลิลิตร ลงในถุงซึ่งบรรจุน้ำพริกแกง 25 กรัม ทดลองในน้ำพริกแกงทั้ง 2 ชนิด แต่เติม *B. licheniformis* ลงเฉพาะในน้ำพริกแกงเผ็ด เพราะแยกได้จากน้ำพริกแกงเผ็ดอย่างเดียว ซึ่งน้ำพริกแกงที่ใช้ได้ผ่านการฉายรังสีในระดับที่ทำให้ปลอดเชื้อมาแล้ว ผสมตัวอย่างให้แบคทีเรียบริสุทธิ์กับน้ำพริกแกงเข้ากันด้วยเครื่อง stomacher แล้วเก็บ 2 สภาวะ คือ สภาวะมีอากาศ ด้วยการรัดปากถุงด้วยหนังยาง โดยให้มีสัดส่วนอากาศต่อปริมาตรบรรจุเท่ากับ 10:1 กับสภาวะบรรจุแบบสุญญากาศ ด้วยเครื่อง WEBOMATIC รุ่น EASY PACK 05LC4599 ด้วยความดัน 1.0 บาร์ เก็บที่อุณหภูมิห้อง *C. perfringens* เก็บเฉพาะที่สภาวะบรรจุแบบสุญญากาศ ตรวจปริมาณแบคทีเรียแต่ละชนิด (ภาคผนวก ข.2-ข.5) หลังเติมทันทีและทุกวัน จนครบ 1 สัปดาห์ สำหรับตัวอย่างที่เติม *B. circulans* และ *B. licheniformis* จะมีการตรวจประเมินด้านกลิ่นทางประสาทสัมผัสโดยวิธี Qualitative Descriptive Analysis with Scoring Test ด้วยแบบทดสอบ (ภาคผนวก ค.1) ใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝน 15 คน ทดสอบวันที่ 0 และทุกวัน กระทั่งครบ 1 สัปดาห์หรือจนกว่าจะเสีย (เกณฑ์การเสีย คือ คะแนนเฉลี่ยต่ำกว่า 5 จากคะแนนเต็ม 9) ควบคู่ไปด้วย เพื่อยืนยันว่าแบคทีเรียชนิดนี้เป็นสาเหตุการเสียในน้ำพริกแกง

3.3 ศึกษาผลการแปรปริมาณโคโตซาน ค่า pH และ a_w ต่อการถนอมรักษาน้ำพริกแกง

3.3.1 การตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ในวัตถุดิบ

ตรวจปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด *C. perfringens* *E.coli* *Salmonella* sp. *S. aureus* (ภาคผนวก ข.2-ข.5) ในเครื่องเทศที่เตรียมลักษณะเดียวกันกับข้อ 3.1.1 และวัตถุดิบอื่นๆ ที่ใช้เป็นส่วนผสมในน้ำพริกแกงเผ็ดและน้ำพริกแกงส้ม ได้แก่ ลูกผักชี ผิวมะกรูด รากผักชี กระป๋องยี่ห่วย และเมล็ดพริกไทย

3.3.2 การตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ในน้ำพริกแกง

ตรวจแบคทีเรีย ได้แก่ *C. botulinum* *C. perfringens* *E.coli* *Salmonella* sp. และ *S. aureus* (ภาคผนวก ข.1-ข.6) ในน้ำพริกแกงเผ็ดและน้ำพริกแกงส้มที่เตรียมด้วยสูตรดัดแปลงจาก ศรีสมร คงพันธุ์ (2543) สุ่มตัวอย่างมาตรวจทุกวันจนครบ 1 สัปดาห์ หรือ กระทั่งตรวจไม่พบ

3.3.3 ศึกษาผลของการแปรปริมาณไคโตซาน ค่า pH และ a_w ต่อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเสียในน้ำพริกแกง และการยอมรับทางประสาทสัมผัส

แปรปริมาณไคโตซาน (วิธีเตรียมไคโตซานตามภาคผนวก ง.1) ของน้ำพริกแกงเผ็ดและน้ำพริกแกงส้มเป็น 3 ระดับ คือ 0 0.05 0.1% แปรค่า a_w ด้วยการเติมเกลือแกง เป็น 3 ระดับ ได้แก่ 0.96 0.91 0.86 ในน้ำพริกแกงส้ม และ 0.98 0.93 0.88 ในน้ำพริกแกงเผ็ด และแปรค่า pH ด้วยกรดแลคติก เป็น 3 ระดับ ได้แก่ 5.0 4.5 4.0 ในน้ำพริกแกงส้ม 5.2 4.7 4.2 ในน้ำพริกแกงเผ็ด บรรจุน้ำพริกแกงเผ็ดและน้ำพริกแกงส้มลงถุงลามิเนต PET/Al/Ny/ CPP หน้า 150 ไมครอน ขนาด 100 mm x 130 mm และปิดผนึกสุญญากาศ ด้วยเครื่อง WEBOMATIC รุ่น EASY PACK 05LC4599 ด้วยความดัน 1.0 บาร์ เก็บที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งจะได้ น้ำพริกแกงชนิดละ 27 สูตร วางแผนการทดลองแบบ symmetric factorial experiment 3x3x3 ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (Cohran and Cox, 1992) และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS. สุ่มตัวอย่างน้ำพริกแกงเผ็ดและน้ำพริกแกงส้มมาทดสอบอย่างละ 1 ถุงต่อครั้ง ประเมิน ตรวจ และวัด ดังนี้

- ประเมินผลทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่น สี ของน้ำพริกแกง และกลิ่นรสของแกงที่ปรุงได้จากน้ำพริกแกง ด้วยวิธี qualitative descriptive analysis with scoring test ด้วยแบบทดสอบ (ภาคผนวก ค.1-ค.2) ใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝน 15 คน ทำ 2 ซ้ำ (เกณฑ์การเสีย คือ คะแนนเฉลี่ยต่ำกว่า 5 จากคะแนนเต็ม 9) วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) ทดสอบ 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (Cochran and Cox, 1992) โดยประเมินด้านกลิ่นและสี วันที่ 0 และทุกสัปดาห์ จนกว่าครบ 3 เดือน แต่การประเมินด้านกลิ่นรส ทำวันที่ 0 45 90

- ตรวจปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญที่ 35 และ 55 องศาเซลเซียสในน้ำพริกแกงเผ็ด และปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญที่ 35 องศาเซลเซียส ในน้ำพริกแกงส้ม (ภาคผนวก ข.1) ตรวจถุงละ 2 ซ้ำ

- วัดค่า a_w ด้วยเครื่อง NOVASINA AW SPRINT (TH500) (ภาคผนวก ก.1) ถุงละ 2 ซ้ำ

- วัดค่า pH ด้วยเครื่อง Cyberscan1000 (RS232 meter) (ภาคผนวก ก.2) ถุงละ 2 ซ้ำ

- วัดค่าสีด้วยเครื่อง Minolta Chroma Meter รุ่น CR300 Series (ภาคผนวก ก.3) ถุงละ 2 ซ้ำ

โดยตรวจปริมาณแบคทีเรียและวัดค่าทางกายภาพ ในวันที่ 0 และทุกสัปดาห์ จน

ครบ 3 เดือน



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย