บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ สารเคมีและวัตถุดิบ

ในการวิจัยนี้มีการตรวจวัดทั้งทางกายภาพ เคมี และทางจุลชีววิทยา โดยใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ สารเคมี วัตถุดิบในการทำแหนม และอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้

เครื่องมือและอุปกรณ์

สามารถจำแนกออกตามชนิด รุ่น และประเทศผู้ผลิต ดังรายการข้างล่าง

- เครื่องบดเนื้อ (mincer)(TS-22, Omas, Italy)
- เครื่องหั่นหนังสุกร (ผลิตที่ 71/99 ถ.ซุปเปอร์ไฮเวย์ ต.ช้างเผือก อ.เมือง จ.เชียงใหม่)
- เครื่องผสม (mixer)(HS 150, Hua Min, Taiwan)
- เครื่องอัดไส้ (stuffer)(12 Ltr., F.Dick, Germany)
- เครื่องรัดไส้กรอก (polyclip)(711VO-A.R 713VO-A.R,Maxpackner Co., Ltd.,Japan)
- เครื่องปั่นตัวอย่าง (Waring blender)(CB-6, Waring, USA)
- เครื่องวัดสี (chromameter)(CR-310, Minolta Camera Co.,Ltd.,Japan)
- เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส (material testing)(Instron 5565, USA)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (UV-160A, Shimadzu cooperation, Japan)
- ตู้เขี่ยเชื้อปลอดโรค (labgard)(425, Naire, USA)
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (autoclave)(HA-30, Hirama, Japan)
- ตู้อบอุณหภูมิสูง (250 องศาเซลเซียส)(D3165, Kottermann, W.Germany)
- ตู้เพาะเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator)(B6200, Heraeus, Germany)

- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath with low water cut-off and cover) (1004, GFL, Germany)

- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (weighing machine readability 0.01 g) (ME-703447, Mettler-Toledo AG)

- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (weighing machine readability 0.0001 g) (A120s, Sartorius, Germany)

- เครื่องเขย่าหลอดทดลอง (vortex-genie) (K-550-GE, Scienctific Industries, USA)

- เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge) (5010 table top centifuge, Kubota, Japan)

- เครื่องกรองสุญญากาศโดยใช้ vacuum pump (Medi-pump 1132 B, Thomas Industry, USA)

- แผ่นให้ความร้อน (hot plate) (12607, E.G.O, W.Germany)

- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) (520 A, Haldenwanger, Germany)

- โถดูดความชื้น (desiccator)(GL 32, Haldenwanger, Germany)

- เครื่องเจือจางตัวอย่าง (stomacher lab blender) (400 (BA 7021), Seward medical, UK)

สารเคมี

ใช้สารเคมีต่างๆในงานวิจัยดังนี้

- กรดแลคติค (Merck, Germany)
- กรดอะเซติค (Merck, Germany)
- กรดไฮโดรคลอริค (37%) (Riedel-Dehean, Germany)
- กลูโคส (Fluka, Switzerland)
- กลูโคโน เดลตา แลคโตน (Sigma, USA)
- คอปเปอร์ซัลเฟต (Merck, Germany)
- ซัลฟานิลาไมด์ (Fluka, Switzerland)
- โซเดียมคลอไรด์ (Merck, Germany)

- โซเดียมไตรโพลิฟอสเฟต (Aldrich Chemical Co.Inc., USA)
- โซเดียมไนเตรท (BDH Chemical Ltd., England)
- โซเดียมไนไตรท์ (Fluka, Switzerland)
- โซเดียมอิริธอร์เบท (Sigma, USA)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Merck, Germany)
- N-1-แนพธิลเอทธิลีนไดเอมีนไดไฮโดรคลอไรด์ (Fluka, Switzerland)
- โปแตสเซียมไนเตรท (Fluka, Switzerland)
- โปแตสเซียมไฮโดรเจนพาธาเลท (May & Baker Ltd., England)
- ฟีนอล (Merck, Germany)
- ฟีนอลฟ์ธาลีน (Fluka, Switzerland)
- อะซิโตน (J.T.Baker, USA)
- ไฮดราซีนซัลเฟต (Sigma, USA)
- โปแตสเซียมเทลลูไรท์ (Sigma, USA)

วัตถุดิบในการทำแหนม

เนื้อแดงสุกร ใช้เฉพาะส่วนสะโพกจากบริษัทจงเจริญฟาร์ม ซึ่งตั้งอยู่ ณ กิโลเมตรที่ 12 บนทางหลวงหมายเลข 108 เลขที่ 167/1 หมู่ 8 ตำบลบ้านกาด อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่

หนังสุกร ใช้หนังสุกรที่หั่นเรียบร้อยแล้ว ความหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร จากบ้านเลขที่ 71/99 ถ.ซุปเปอร์ไฮเวย์ ต.ช้างเผือก อ.เมือง จ.เชียงใหม่

ข้าวเหนียวนึ่งสุก ข้าวสารสุก กระเทียม และพริกขี้หนู จากตลาดต้นพยอม อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

พริกไทยบ่น ตราพวงมาลัยทอง จำหน่ายโดยชัยยงวัฒนา 21/2 ถนนบางคล้า-แปลงยาว อำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา

ผงชูรส (Monosodium glutamate , MSG) ของบริษัทอะยิโนะโมะโต๊ะ (ประเทศไทย) จำกัด

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

สามารถจำแนกออกได้ตามชนิดของจุลินทรีย์ที่ศึกษา ดังรายการต่อไปนี้

จุลินทรีย์	อาหารเลี้ยงเชื้อ
Lactobacillus plantarum	Bacto lactobacilli MRS broth
Pediococcus cerevisiae	Bacto lactobacilli MRS broth
Micrococcus varians	Bacto brain heart infusion broth
Enterobacteriaceae	Bacto violet red bile agar
Staphylococcus aureus	Bacto Baird-Parker agar base
Salmonella sp.	Bacto tryptic soy broth
	Bacto selenite cystine broth
	Bacto bismuth sulfite agar
	Bacto triple sugar iron agar
	Bacto urea broth
	Bacto differentiation disks ONPG
จุลินทรีย์ทั้งหมดข้างต้น	Bacto peptone

ทั้งนี้อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดข้างต้นเป็นของบริษัท Difco Laboratory

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 ศึกษาชนิดและปริมาณสารเคมีที่ให้ความเป็นกรดที่มีผลต่อหัวเชื้อบริสุทธิ์แต่ละชนิด

ตัวแปรที่ศึกษาในขั้นตอนดังกล่าวมีดังนี้

3.2.1.1 หัวเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น โดยใช้ Micrococcus varians ใน Brain heart infusion (BHI) broth, Lactobacillus plantarum ใน MRS broth และ Pediococcus cerevisiae ใน MRS broth เหตุที่ต้องใช้หัวเชื้อบริสุทธิ์ถึง 3 ชนิด เพราะแต่ละชนิดจะมีบทบาทที่ต่างกันในระบบการหมัก กล่าวคือ M.varians สามารถเปลี่ยนสารไนเตรทเป็นสารไนไตรท์ทำให้เกิดสีชมพูของ nitrosomyoglobin ในผลิตภัณฑ์ได้ ส่วน L.plantarum และ P.cerevisiae จะผลิตกรดแลคติคแล้วทำให้ผลิตภัณฑ์มีสภาพเป็น

กรดขึ้น และช่วยในด้านการเกาะตัวกันของผลิตภัณฑ์ด้วย (Pairote Wiriyacharee, 1990) ด้วยเหตุนี้จึงต้องเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมก่อน เพื่อให้เชื้อสามารถทำกิจกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อทำได้โดยเขี่ยเชื้อจาก slant ลงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมและผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับ M.varians และ 24 ชั่วโมงสำหรับ L.plantarum และ P. cerevisiae เมื่อครบเวลาตามกำหนด ให้ปิเปตเชื้อที่ได้ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมใหม่อีกครั้งหนึ่ง เพาะเลี้ยงที่เวลาและอุณหภูมิเดิม ทั้งนี้เพื่อควบคุมปริมาณเชื้อดังกล่าวให้คงที่ และก่อนที่จะนำไปใช้ในการทดลองให้ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในปริมาณร้อยละ 1 โดยปริมาตร เพาะเลี้ยงที่เวลาและอุณหภูมิดังกล่าวข้างต้น จากนั้นให้ปั่นแยกเซลจุลินทรีย์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที และถ่ายเซลที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่มีปริมาตรเท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม ทั้งนี้เพื่อให้เชื้อได้รับอาหารที่สมบูรณ์ก่อนนำไปศึกษา

3.2.1.2 สารเคมีที่ให้ความเป็นกรด ได้แก่ GDL และกรดแลคติค โดยปริมาณที่ใช้แปรที่ระดับร้อยละ 0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 โดยน้ำหนัก

ทดลองโดยเลี้ยงหัวเชื้อบริสุทธิ์แต่ละชนิดที่ได้จากข้อ 3.2.1.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมโดยใช้ปริมาณเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตรซึ่งจะได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ M. varians L.plantarum และ P.cerevisiae ประมาณ 10^6, 10^8 และ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เติมสารเคมีที่ให้ความเป็นกรดในปริมาณต่างๆ ลงไป และเติมโซเดียมไนเตรท ร้อยละ 0.15 (โดยน้ำหนัก) หรือ 1500 ppm ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างตลอดช่วงเวลา 48 ชั่วโมงของการหมักสำหรับ M.varians และตลอดช่วงเวลา 24 ชั่วโมงของการหมักสำหรับ L.plantarum และ P.cerevisiae เหตุที่ใช้ช่วงเวลาในการสุ่มตัวอย่างต่างกันเพราะเชื้อแต่ละชนิดมีอัตราการเจริญเติบโตเพื่อเข้าสู่ช่วง stationary phase ต่างกัน (ไพโรจน์ วิริยจารี และคณะ, 2537 ก,ข) โดยตรวจวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ความเป็นกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแลคติคตามวิธีของ AOAC (1984) และนับจำนวนเชื้อที่มีชีวิตโดยอาศัยเทคนิคการ pour plate และ layer plate ทั้งนี้จะทราบการเปลี่ยนแปลงของระบบที่ศึกษาและผลกระทบของสารเคมีที่ให้ความเป็นกรดต่อเชื้อบริสุทธิ์แต่ละชนิดตลอดระยะเวลา 48 หรือ 24 ชั่วโมง ทำให้ทราบชนิด

และปริมาณของสารเคมีที่ให้ความเป็นกรดที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) ขนาด 3x2x5 (เชื้อจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ สารเคมีที่ให้ความเป็นกรด 2 ชนิด และความเข้มข้นของสารเคมีที่ให้ความเป็นกรด 5 ระดับ ตามลำดับ) โดยแบ่งเป็น 6 blocks (block ละ 5 สิ่งทดลอง) ผลที่ได้จะนำมาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p \leq 0.05$ โดยอาศัยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปของ Walonick (1987)

3.2.2 ศึกษาการใช้สารเคมีที่ให้ความเป็นกรดในปริมาณที่เหมาะสมและหัวเชื้อผสมในผลิตภัณฑ์แหนม

ตัวแปรที่ศึกษาในขั้นตอนดังกล่าวมีดังนี้

3.2.2.1 สารเคมีที่ให้ความเป็นกรด ได้แก่ GDL และกรดแลคติค ในปริมาณที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 3.2.1 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมอีก 1 การทดลอง

3.2.2.2 หัวเชื้อบริสุทธิ์โดยใช้หัวเชื้อผสมทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับการใช้เชื้อ M.varians เพียงชนิดเดียวและการไม่ใช้หัวเชื้อบริสุทธิ์ใดๆเลย ซึ่งเป็นชุดควบคุม

วิธีทดลองคือผลิตแหนมโดยอาศัยสูตรพื้นฐานการทำแหนมดังต่อไปนี้

สูตรพื้นฐานการทำแหนม (ไพโรจน์ วิริยจารี ลักขณา รุจนะไกรกานต์ และ อำพิน กันธิยะ,2536)

		ร้อยละ
ส่วนของเนื้อ	เนื้อแดงสุกร (ส่วนสะโพก)	60
	หนังสุกร	40
		ร้อยละของส่วนของเนื้อ
สารเคมี	โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	2.0
	โซเดียมไนเตรท (sodium nitrate)	0.05
	โซเดียมไนไตรท์ (sodium nitrite)	0.02
	โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต (sodium tripolyphosphate)	0.3
	โซเดียมอิริธอร์เบท (sodium erythorbate)	0.05

		ร้อยละของส่วนของเนื้อ
ส่วนผสมอื่น	กลูโคส	0.5
	ข้าวเหนียวนึ่งสุกบดละเอียด	1.0
	ข้าวสารสุกบดละเอียด	3.0
	กระเทียมปอกเปลือกและบดละเอียด	4.0
	พริกไทยบ่น	0.05
	พริกขี้หนูบดละเอียด	1.0
	ผงชูรส	0.2
		CFU/g ส่วนของเนื้อ
หัวเชื้อบริสุทธิ์	M.varians	10^3
	L.plantarum	10^3
	P.cerevisiae	10^6

การเตรียมวัตถุดิบ นำเนื้อแดงของสุกรที่ได้จากบริษัทจงเจริญฟาร์มมาเลาะเอามันและพังผืดออกแล้วล้าง ทิ้งให้สะเด็ดน้ำ เช็ดด้วยผ้าสะอาดแล้วผ่านเครื่องบดอย่างหยาบ (ขนาดรูเปิด 0.5 มิลลิเมตร) เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ (ประมาณ 4 องศาเซลเซียส) ส่วนหนังสุกรให้ล้างด้วยน้ำสะอาด ต้มในน้ำเดือดประมาณ 5 นาที ทิ้งให้เย็นและสะเด็ดน้ำ แล้วหั่นให้เป็นเส้นยาวประมาณ 10 เซนติเมตร ความหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร เก็บที่อุณหภูมิต่ำ สำหรับข้าวเหนียวนึ่งสุกให้ล้างเมือกออกก่อนด้วยน้ำสะอาด ทิ้งให้สะเด็ดน้ำแล้วจึงบดให้ละเอียด ส่วนผสมทุกอย่างยกเว้นของแห้งให้เก็บที่อุณหภูมิต่ำเพื่อรอขั้นตอนการผสม

การเตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์ นำเชื้อแบคทีเรียประเภท nitrate reducing bacteria (M.varians) และประเภท lactic acid bacteria (L.plantarum และ P.cerevisiae) ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth นาน 48 ชั่วโมง และ Lactobacilli MRS broth นาน 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจนับปริมาณเชื้อที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวโดยใช้เทคนิคการ pour plate และ layer plate อาหารเลี้ยงเชื้อนี้เรียกว่า stock culture แล้วคำนวณการเตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์ให้ได้ตามปริมาณที่ระบุในสูตรพื้นฐาน

การผสม นำส่วนของเนื้อ สารเคมี และส่วนผสมอื่น ผสมเข้าด้วยกันในเครื่องผสม โดยใช้ใบพัดรูปตัว K ที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที (speed 1) เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นปรับเป็นความเร็วที่ 70 รอบต่อนาที (speed 2) เป็นเวลา 1 นาที แล้วเติมหัวเชื้อบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิด ผสมที่ speed 2 เป็นเวลาอีก 1 นาที บรรจุส่วนผสมในหลอดพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร ให้มีน้ำหนัก 100 กรัมต่อแท่ง ด้วยเครื่องอัด (stuffer) ปิดหัวท้ายหลอดด้วยเครื่อง polyclip นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างที่เวลาการหมักผ่านไป 0 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง (รูป 3.1)

เกณฑ์ที่ใช้ในการเลือกปริมาณที่เหมาะสมในขั้นตอนนี้ได้แก่ (รายละเอียดในภาคผนวก ก)

- pH (AOAC,1984)
- ความเป็นกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแลคติค (AOAC, 1984)
- ปริมาณสารไนเตรทโดย hydrazine reduction method (ประยุกต์จากวิธีของ Kamphake ,Hannah and Cohen,1967)
- ปริมาณสารไนไตรท์ที่เหลือ(residual nitrite) โดย colorimetric method (AOAC,1984)
- สีของผลิตภัณฑ์โดยเครื่องวัดสี chromameter รุ่น CR-310 ของบริษัท Minolta Camera Co.,Ltd. ปี คศ. 1991
- ค่าแรงกดและแรงตัดขาดโดยเครื่อง material testing ของบริษัท Instron รุ่น 5565
- ปริมาณจุลินทรีย์พวก Enterobacteriaceae (Kiss, 1984)
- ปริมาณ Staphylococcus aureus (Kiss, 1984)
- ปริมาณ Salmonella sp. (AOAC, 1984; อดิศร เสวตวิวัฒน์, 2533)
- ลักษณะทางประสาทสัมผัสโดย semi-trained panelists จำนวน 20 คน และใช้วิธีการทดสอบแบบ quantitative descriptive analysis

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ completely randomized design (CRD) ขนาด 3x3

3.2.3 ศึกษาปริมาณสารไนเตรทและสารไนไตรท์ที่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์แหนมที่ใช้สารเคมีที่ให้ความเป็นกรดและหัวเชื้อผสม

ตัวแปรที่ศึกษาในขั้นตอนดังกล่าวมีดังนี้

3.2.3.1 ปริมาณสารไนเตรท (sodium nitrate) 2 ระดับ โดยแปรที่ 500 ppm และ 200 ppm โดยน้ำหนัก

3.2.3.2 ปริมาณสารไนไตรท์ (sodium nitrite) 2 ระดับ โดยแปรที่ 200 ppm และ 100 ppm โดยน้ำหนัก

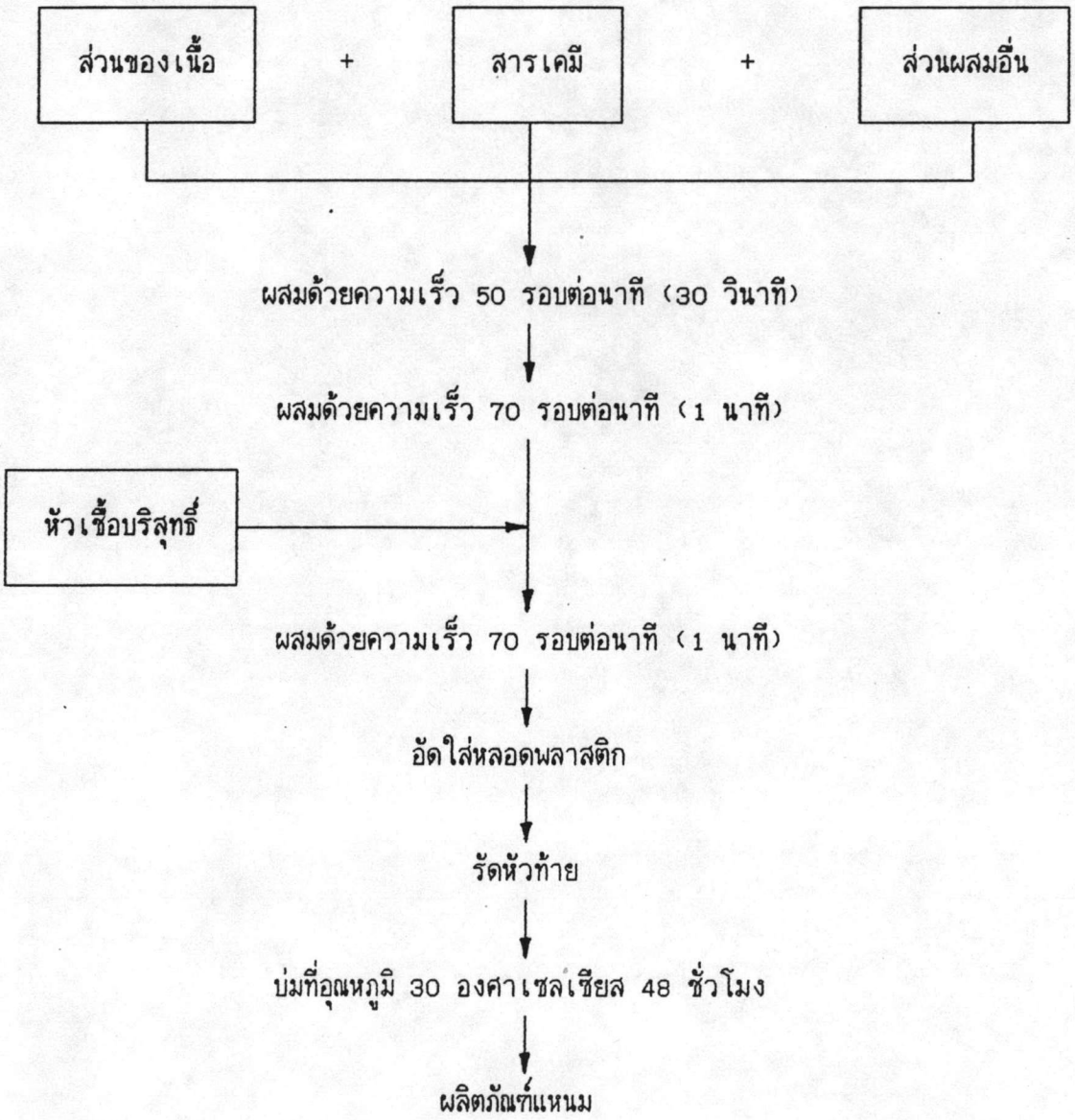
ทดลองเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.2.2

เกณฑ์ที่ใช้ในการเลือกปริมาณที่เหมาะสมในขั้นตอนนี้ได้แก่ (รายละเอียดในภาคผนวก ก)

- pH (AOAC, 1984)
- ความเป็นกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแลคติค (AOAC, 1984)
- สีของผลิตภัณฑ์โดยเครื่องวัดสี chromameter รุ่น CR-310 ของบริษัท Minolta Camera Co.,Ltd. ปี คศ.1991
- ปริมาณสารไนเตรท โดย hydrazine reduction method (ประยุกต์จากวิธีของ Kamphake et al., 1967)
- ปริมาณสารไนไตรท์ที่เหลือ(residual nitrite) โดย colorimetric method (AOAC, 1984)
- ปริมาณจุลินทรีย์พวก Enterobacteriaceae (Kiss, 1984)
- ปริมาณ Staphylococcus aureus (Kiss, 1984)
- ปริมาณ Salmonella sp.(AOAC, 1984 ; อดิศร เสวตวิวัฒน์, 2533)

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ factorial design ขนาด 2^2 ร่วมกับ 3 centerpoints

<u>ขั้นตอนการผลิต</u>



รูป 3.1 ขั้นตอนการผลิตผลิตภัณฑ์แหนม