บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีทดลอง

1. อุปกรณ์ วัตถุดิบ สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1.1 อุปกรณ์

- กรรไกรและปากคีบสแตนเลส
- กระดาษกรอง ("filter paper" No.1, Whatman, England)
- กระป๋องอลูมิเนียม
- ขวดแก้วทนความร้อนพร้อมฝาปิด ขนาด 100 250 และ 500 มิลลิลิตร
- เข็มฉีดตัวอย่าง ("microliter syringes" Hamilton , Switzerland) ความจุ 10 ไมโครลิตร
- คอลัมน์สำหรับวิเคราะห์ลิควิดโครมาโตรกราฟ (Spherisorb ODS 2 , Hewlett packard ,Germany) ขนาดของคอลัมน์ 125 x 4 มิลลิเมตร
- เครื่องกวนผสม ("magnetic stirrer" Model L344, Labinco, Netherland)
- เครื่องเขย่าหลอดทดลอง ("vortex" Model G-560E , Scientific Industries Inc., U.S.A.)
- เครื่องชั่ง ("analytical balance" Model BP 3100S, Satorius AG, Germany)
- เครื่องชั่ง ("analytical balance" Model CH-8606, Mellter, Switzerland)
- เครื่องตีบดอาหาร ("blender stomacher" Model BWS 99 Chemical., England)
- เครื่องทำความสะอาดแบบอัลตร้าโซนิค ("ultrasonic cleanner cavitator" Model ME 4.6,Mettler Electronics corp , U.S.A.)
- เครื่องปั่นผสม ("mechanical blender" Model MX-T31 GN, National, Taiwan)
- เครื่องปิดผนึกแบบสุญญากาศหรือฉีดพ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ("sealer" Model VM 2010, Audionvac, USA)
- เครื่องย่อยตัวอย่าง ("digester" Model 1007, Tecator, Sweden)
- เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟ ("liquid chromatograph" HP 1050 Series, Hewlett packard , Germany)
- เครื่องวัด pH ("pH meter" Model pH 537 , Wissenschaftlich- Technische Werkstatten , Germany)
- เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง ("spectrophotometer" Model V-530 Jusco Co.,Ltd., Japan)

- เครื่องวัดค่าน้ำที่เป็นประโยชน์ ("a_w-box" Model AWC 200, Novasina, Switzerland)
- เครื่องวัดสี ("colorimeter" Model CR 300 , Minolta Camera Co., Ltd., Japan)
- เครื่องสกัดไขมัน ("soxhlet apparatus" Soxtec 2050 , Tecator , Sweden)
- เครื่องอบแห้งแบบถาด ("tray drier" Model PE-555, Progress, USA)
- จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- ชุดกลั่นไนโตรเจน ("semi-micro distillation set")
- ชุดกลั่นอย่างง่าย ("distillation set")
- ชุดอุปกรณ์ทดสอบซิม
- ตะแกรงเหล็กปลอดสนิม
- ตัวกรอง ("filter" Minisart RC 4 / CH-membrane / hydrophilic, Sartorius AG, Germany) เส้นผ่าศูนย์กลางรูเปิด 0.45 ไมครอน
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (Lanna Foods and Supplied Co.,LTD., Thailand)
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (Type B1112 V, Termaks, Norway)
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส (Model SR-F381, Sanyo, Thailand)
- ตู้แช่แข็ง ("freezer" Model SF-C98 GB, Sanyo, Thailand)
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (Type KT500, Heraeus Instrument)
- ตู้อบเพาะเชื้อ ("incubator" Model B6200 , Heraeus Instrument)
- ตู้อบลมร้อน ("hot air oven" Type T 1119 UV, Termaks, Norway)
- เตาเผาอุณหภูมิสูง ("muffle furnance" Model FSE 520, Gallenkamp, England)
- เตาให้ความร้อน ("heating mantle" Type KI2, Gerhardt Bonn,Germany)
- ถุงตีบดอาหาร ("stomacher bag" Seward Medical Ltd, U.K.)
- ถุงพลาสติกโพลิโพรไพลีน
- ถุงพลาสติกสำหรับบรรจุปลาหมักกึ่งแห้ง เป็นถุงสองชั้นๆ ในเป็นโพลิเอทิลีนชนิดความหนาแน่นต่ำเชิงเส้น ชั้นนอกเป็นไนลอน (linear low density polyethylene/ nylon) ขนาดกว้าง 190 มิลลิเมตร ยาว 270 มิลลิเมตร และหนา 80 ไมครอน (บริษัทที.อาร์.ซี. โพลี่แพค จำกัด 77 หมู่ 8 ตำบลดอกไม้ เขตประเวศ ถนนบางนา-ตราด กรุงเทพมหานคร)
- ถุงมือยาง ("glove latex disposable")
- โถดูดความชื้น
- นาฬิกาจับเวลา

- แบบสอบถาม (รายละเอียดในภาคผนวก ข)
- ปั๊ม ("pump" Model 1132B , Thomas Industries Inc., U.S.A.)
- ปิเปตขนาด 1 , 5 และ 10 มิลลิลิตร
- แผ่นกรองชนิดเซลลูโลสอะซิเตต ("cellulose acetate filter" , Sartorius AG , Germany) เส้นผ่านศูนย์กลางรูเปิด 0.2 ไมโครเมตร
- ไมโครปิเปต
- หม้อนึ่งความดัน ("autoclave" Model AVC-3167, IWAKI Glass Co., Ltd., Japan)
- หลอดแก้วทนความร้อนพร้อมฝาปิด
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ ("water bath" Model D1004, GFL, Germany)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ ("water bath" Model 1004, GFL, Labortechnik, Germany)
- อินทิเกรเตอร์ ("integrator" HP 3396 Series III , Hewlett packard , Germany)

1.2 วัตถุดิบ

- ปลานวลจันทร์เทศ (ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัทไร่กำนันจุล คุ้นวงศ์ จำกัด สามแยกวังชมภู อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์)
- เกลือ ("sodium chloride" ตราปุ่รุงทิพย์ บริษัทอุตสาหกรรมเกลือบริสุทธิ์จำกัด 146 หมู่ 3 ถนนตลาดแค-พิมาย ตำบลกระเบื้องใหญ่ อำเภอพิมาย จังหวัดนครราชสีมา)
- น้ำตาลทราย ("sucrose" ตรามิตรผล บริษัทน้ำตาลมิตรผล 109 หมู่ 10 อำเภอ ด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี)
- ผงชูรส ("monosodium glutamate" ตราอายิโนะโมะโต๊ะ บริษัทอายิโนะโมะโต๊ะ ประเทศไทย จำกัด)

1.3 สารเคมี

- กรดซอร์บิค ("sorbic acid" ; $C_6H_8O_2$, Fluka, Switzerland)
- กรดซัลฟิวริค ("sulfuric acid" ; H_2SO_4, Merck, Germany)
- กรดไดไนโตรซาลิไซลิค ("3,5-dinitrosalicylic acid" ; $C_7H_4N_2O_7$, Fluka, Switzerland)
- กรดไตรคลอโรอะซิติค ("trichloroacetic acid" ; CClCOOH, Merck, Germany)
- กรดไธโอบาร์บิทูริค ("2-thiobarbituric acid" ; $C_4H_4N_2O_2S$, Fluka, Switzerland)
- กรดบอริค ("boric acid" ; H_3BO_3, Seelze-Hannover, France)
- กรดอะซิติค ("acetic acid" ; CH_3COOH, Merck, Germany)

- กรดไฮโดรคลอริค ("hydrochloric acid" ; HCl, Merck, Germany)
- กลูโคส ("D(+)-glucose" ; $C_6H_{12}O_6$, Fluka, Switzerland)
- คอปเปอร์ซัลเฟต ("copper sulfate" ; $CuSO_4\ 5H_2O$, Merck, Germany)
- ซิงค์อะซิเตตไดไฮเดรท ("zinc acetate dihydrate" ; $(CH_3OO)_2Zn\ 2H_2O$, Merck, Germany)
- ซิลเวอร์ไนเตรต ("silver nitrate" ; $AgNO_3$, Merck, Germany)
- เซเลเนียมไดออกไซด์ ("selenium dioxide" ; SeO_2, J.T. Baker, U.S.A.)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ ("sodium hydroxide" NaOH, J.T. Baker, U.S.A.)
- โบรโมครีซอลกรีน ("bromocresol green" ; $C_{21}H_{14}Br_4O_5S$, Merck, Germany)
- ปิโตรเลียมอีเธอร์ ("petroleum ether" จุดเดือด 40 - 60 องศาเซลเซียส,J.T. Baker, U.S.A.)
- โปแตสเซียมโครเมต ("potassium chromate" ; K_2CrO_4, Fluka,Switzerland)
- โปแตสเซียมซอร์เบท ("potassium sorbate"; $KC_6H_7O_2$, Merck, Germany)
- โปแตสเซียมไดโครเมต ("potassium dichromate" ; $K_2Cr_2O_7$, Merck, Germany)
- ฟีนอล ("phenol" ; C_6H_5OH, J.T.Baker, U.S.A.)
- เมทธิลเรด ("methyl red" ; $(CH_3)_2NC_6H_4N$, May&Baker, England)
- เมทธิลแอลกอฮอล์ ("methyl alcohol" ; CH_3OH, J.T. Baker, U.S.A.)
- เอทธิลแอลกอฮอล์ ("ethyl alcohol" ; C_2H_5OH, J.T. Baker, U.S.A.)

1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- เปปโตนวอเตอร์ ("peptone water" Merck, Germany)
- โปเตโต้เดกซ์โตรสเอก้า ("potato dextrose agar" Merck, Germany)
- เพลทเค้าท์เอก้า ("plate count agar" Merck, Germany)

1.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

- เครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล
- โปรแกรมสำเร็จรูป Mathcad Professional Version 7
- โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft Exel 5.0
- โปรแกรมสำเร็จรูป Statistix Version 4.1

2. วิธีทดลอง

2.1 สูตรและกระบวนการผลิตปลาหมักแห้ง

สูตรและกระบวนการผลิตปลาหมักแห้งของบริษัทไร่กำนันจุล คุ้นวงศ์ จำกัด คือ

- **สูตร**

ปลานวลจันทร์เทศที่หั่นเป็นเส้น	1,500 กรัม
น้ำตาล	40 กรัม
เกลือ	30 กรัม
ผงชูรส	10 กรัม

- **กระบวนการผลิต**

ผสมน้ำตาล เกลือและผงชูรสเข้าด้วยกัน แล้วเทลงในเนื้อปลานวลจันทร์เทศคลุกเคล้าให้เข้ากันเป็นเวลา 4 นาที นำเนื้อปลาที่คลุกเคล้าดีแล้วใส่ในถุงโพลิโพรไพลีนมัดปากถุงแล้วนำไปใส่ตู้เย็นที่มีอุณหภูมิประมาณ 2 – 4 องศาเซลเซียส เพื่อหมักเนื้อปลาเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำเนื้อปลามาเรียงบนตะแกรงเหล็กปลอดสนิม แล้วนำไปอบในเครื่องอบแห้งที่มีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 5 ชั่วโมง แกะเนื้อปลาออกจากตะแกรง ใช้กรรไกรตัดให้เนื้อปลามีความยาวประมาณ 7 – 8 เซนติเมตร บรรจุปลาหมักแห้งในถุงพลาสติก

2.2 การดำเนินการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ตอน ดังนี้

2.2.1 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการอบปลาหมักกึ่งแห้ง

วิธีการคือ เตรียมตัวอย่างตามสูตรและกระบวนการผลิตในข้อ 2.1 โดยระหว่างการอบเนื้อปลาในชั่วโมงที่ 0 , 1.0 , 2.0 , 2.5 , 3.0 , 3.5 , 4.0 , 4.5 , 5.5 และ 6.0 จะสุ่มตัวอย่างเนื้อปลามาวิเคราะห์หาค่าน้ำที่เป็นประโยชน์และปริมาณความชื้น ทำการทดลอง 2 ครั้ง แล้วหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการอบให้ปลาหมักแห้งมีค่าน้ำที่เป็นประโยชน์อยู่ในช่วงของอาหารกึ่งแห้ง

2.2.2 ศึกษาปริมาณโปแตสเซียมซอร์เบทที่ใช้ในการผลิตปลาหมักกึ่งแห้ง

ปลาหมักกึ่งแห้งที่ผ่านการอบแห้งด้วยเวลาที่เหมาะสมตามข้อ 2.2.1 เป็นอาหารที่มีค่าน้ำที่เป็นประโยชน์ในระดับปานกลางซึ่งเป็นระดับที่จุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ แต่อาจจะมีปัญหาเรื่องของเชื้อราและเชื้อยีสต์ที่อาจจะเจริญเติบโตได้ (ไพโรจน์, 2539) การใช้โปแตสเซียมซอร์เบทร่วมกับการอบแห้งจะช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและเชื้อยีสต์ได้ แต่เนื่องจากมาตรฐานอาหารอนุญาตให้มีโปแตสเซียมซอร์เบทในอาหารทั่วไปได้ไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (กระทรวงสาธารณสุข, 2527) ดังนั้นจึงต้องศึกษาปริมาณโปแตสเซียมซอร์เบทที่ใช้ในการผลิตปลาหมักกึ่งแห้งที่จะทำให้มีกรดซอร์บิคในปลาหมักกึ่งแห้งไม่เกินที่มาตรฐานกำหนด

วิธีการคือ ผลิตปลาหมักกึ่งแห้งตามข้อ 2.1 โดยใช้โปแตสเซียมซอร์เบทในปริมาณร้อยละ 0.04 , 0.06 , 0.08 , 0.10 และ 0.12 คิดเทียบน้ำหนักปลาสด หลังจากอบเนื้อปลาในเครื่องอบแห้งตามระยะเวลาที่ได้จากข้อสรุปในข้อ 2.2.1 จะนำตัวอย่างปลาหมักกึ่งแห้งของแต่ละตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดซอร์บิค โดยทำการทดลอง 2 ครั้ง นำผลการทดลองไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงสถิติแบบการวิเคราะห์ความถดถอย (regression analysis) เพื่อหาสมการความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปแตสเซียมซอร์เบทที่ใช้ในการผลิต กับปริมาณกรดซอร์บิคในปลาหมักกึ่งแห้ง

2.2.3 การศึกษาผลของโปแตสเซียมซอร์เบท การบรรจุหีบห่อแบบปรับสภาพบรรยากาศ และอุณหภูมิในการเก็บ ที่มีต่ออายุการเก็บของปลาหมักกึ่งแห้ง

ปลาหมักกึ่งแห้งที่ใช้โปแตสเซียมซอร์เบทและผ่านการอบแห้งอย่างเหมาะสมย่อมมีความคงทนต่อจุลินทรีย์ แต่อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางด้านสี การเกิดออกซิเดชั่นของน้ำมันและไขมัน การเกิดสีน้ำตาล และการสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการได้หากเก็บรักษาปลาหมักกึ่งแห้งในสภาวะที่ไม่เหมาะสม การเกิดออกซิเดชั่นของน้ำมันและไขมันสามารถควบคุมได้โดยการบรรจุปลาหมักกึ่งแห้งแบบปรับสภาพบรรยากาศ เพื่อให้ปลาหมักกึ่งแห้งสัมผัสกับออกซิเจนน้อยที่สุด การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำก็เป็นอีกทางหนึ่งที่หน่วงเหนี่ยวการเกิดออกซิเดชั่นได้ ตลอดจนยังมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และปฏิกิริยาทางเคมีอื่นๆ อีกด้วย ดังนั้นจึงทำการศึกษาอิทธิพลของปัจจัย 3 ปัจจัยคือ การใช้โปแตสเซียมซอร์เบท การบรรจุหีบห่อแบบปรับสภาพบรรยากาศ และอุณหภูมิในการเก็บรักษา ที่มีต่ออายุการเก็บของปลาหมักกึ่งแห้ง โดยในแต่ละปัจจัยจะแบ่งออกเป็น 3 ระดับ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

ปัจจัยที่ 1 คือปริมาณโปแตสเซียมซอร์เบท

ระดับต่ำ = 0

ระดับกลาง = ร้อยละ X/2

ระดับสูง = ร้อยละ X

การศึกษาระดับต่ำคือไม่ใช้โปแตสเซียมซอร์เบท ระดับกลางคือปริมาณโปแตสเซียมซอร์เบท (ร้อยละ X/2) ซึ่งจะทำให้มีกรดซอร์บิคในปลาหมักกึ่งแห้ง 400 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ส่วนระดับสูงคือปริมาณโปแตสเซียมซอร์เบท (ร้อยละ X) ซึ่งจะทำให้มีกรดซอร์บิคในปลาหมักกึ่งแห้ง 800 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยปริมาณโปแตสเซียมซอร์เบทที่จะใช้นี้ทราบได้การแทนค่าในสมการความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปแตสเซียมซอร์เบทที่ใช้ กับปริมาณกรดซอร์บิคในปลาหมักกึ่งแห้ง ซึ่งเป็นสมการที่ได้จากการทดลองข้อ 2.2.2

ปัจจัยที่ 2 คือ การบรรจุหีบห่อแบบปรับสภาพบรรยากาศ

ระดับต่ำ = 0 (ไม่ฉีดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์)

ระดับกลาง = ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 30

ระดับสูง = ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 60

โดยบรรจุปลาหมักกึ่งแห้ง 150 กรัม ในถุงพลาสติกชนิด LLDPE/nylon แล้วปิดผนึกปากถุงด้วยเครื่องปิดผนึก การศึกษาระดับต่ำ คือ การปิดผนึกปากถุงในลักษณะสุญญากาศเท่านั้นไม่ได้ฉีดพ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนระดับกลางและระดับสูงจะปิดผนึกปากถุงโดยเครื่องปิดผนึกจะดูดอากาศออกจากถุงให้เป็นสุญญากาศก่อน แล้วพ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ความดัน 1 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร เข้าไปในถุงเป็นปริมาณร้อยละ 30 สำหรับระดับกลาง และร้อยละ 60 สำหรับระดับสูง

ปัจจัยที่ 3 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาปลาหมักกึ่งแห้ง แบ่งออกเป็น

ระดับต่ำ = 5 องศาเซลเซียส

ระดับกลาง = 20 องศาเซลเซียส

ระดับสูง = 35 องศาเซลเซียส

โดยวางแผนการทดลองแบบ 2^3 factorial experiment in CRD with 4 center points ดังตาราง 3.1

ตาราง 3.1 แผนการทดลองแบบ 2^3 factorial experiment in CRD with 4 center points

สิ่งทดลอง	รหัส	ปัจจัยที่ศึกษา		
		ปริมาณโปแตสเซียมซอร์เบท (ร้อยละ)	การบรรจุหีบห่อแบบปรับสภาพบรรยากาศ (ร้อยละของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์)	อุณหภูมิในการเก็บ (องศาเซลเซียส)
	-1*	0	0	5
	0	X/2	30	20
	+1	X	60	35
1	(1)**	-1	-1	-1
2	a	+1	-1	-1
3	b	-1	+1	-1
4	ab	+1	+1	-1
5	c	-1	-1	+1
6	ac	+1	-1	+1
7	bc	-1	+1	+1
8	abc	+1	+1	+1
9	cp_1	0	0	0
10	cp_2	0	0	0
11	cp_3	0	0	0
12	cp_4	0	0	0

* -1 คือ ระดับต่ำ 0 คือ ระดับกลาง และ +1 คือ ระดับสูง

** (1) คือ ควบคุม a คือ ปริมาณโปแตสเซียมซอร์เบท b คือ การบรรจุหีบห่อแบบปรับสภาพบรรยากาศ c คือ อุณหภูมิในการเก็บ และ cp คือ center point

ผลิตปลาหมักกึ่งแห้งและเก็บรักษาตามแผนการทดลองในตาราง 3.1 โดยในระหว่างการเก็บรักษาวันที่ 0 , 7 , 14 , 21 , 35 , 49 , 63 , 77 และ 91 จะนำตัวอย่างของแต่ละสิ่งทดลองมาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้

- ค่าทางเคมี : ค่าน้ำที่เป็นประโยชน์ ปริมาณความชื้น ปริมาณกรดซอร์บิค pH total volatile nitrogen และ thiobarbituric acid value
- ค่าทางกายภาพ : วัดค่าสี L a* b*
- ด้านจุลินทรีย์ : จุลินทรีย์ทั้งหมด เชื้อยีสต์และเชื้อรา
- ด้านประสาทสัมผัส : คุณลักษณะที่ทำการทดสอบคือ สี ลักษณะปรากฏ กลิ่น และการยอมรับรวม

ในวันเริ่มต้นของการเก็บรักษา นอกจากจะวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยค่าต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นแล้ว จะวิเคราะห์ค่าทางเคมีต่อไปนี้เพิ่มเติม คือ ปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า เกลือ และเกลือที่แทรกซึม รวมทั้งน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลรีดิวซ์ที่แทรกซึม โดยวิธีวิเคราะห์ค่าทั้งหมดแสดงไว้ในภาคผนวก ข

ข้อมูลที่ได้ทั้งหมดจะนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงสถิติ เพื่อหาข้อสรุปของการทดลองถึงผลของปริมาณโปแตสเซียมซอร์เบท การบรรจุหีบห่อแบบปรับสภาพบรรยากาศ และอุณหภูมิในการเก็บที่มีต่อคุณภาพของปลาหมักกึ่งแห้ง และเพื่อหาวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตและเก็บรักษาปลาหมักกึ่งแห้ง