บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

1) ซี่โครงหมูอ่อน (บริษัทบริษัท วี แอนด์ พี เฟร็ชฟูดส์ จำกัด, เชียงใหม่)

2) ข้าวเหนียว (ตลาดสด, เชียงใหม่)

3) กระเทียม (ตลาดสด, เชียงใหม่)

4) ผงเพรก (ร้านปิ่นทิพย์, เชียงใหม่)

5) เชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR 543 (สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

6) เชื้อ *Pediococcus acidilactici* TISTR 051 (สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

7) ถุงพลาสติก (ร้านหยก, เชียงใหม่)

8) ยางรัดของ (ร้านหยก, เชียงใหม่)

3.1.2 อุปกรณ์ในการผลิต

1) อุปกรณ์เครื่องครัว

2) เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius AG GOTTINGEN: BP 100, Germany)

3) เทอร์โมมิเตอร์

4) เครื่องปั่น (Blender) (National MX-795N, Malaysia)

PAYAP UNIVERSITY

5) หม้อฝาอบลมร้อน (Otto CO-708, Thailand)

6) ตู้บ่ม (Memmert, Germany)

3.1.3 วัสดุและอุปกรณ์ในการเตรียมเชื้อบริสุทธิ์

1) หม้อนึ่งความดันไอ (Hirayama HA-3D, Japan)

2) เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius BP3100S, Germany)

3) ตู้บ่มเชื้อ (WTB Binder FD240, Germany)

4) ไมโครเวฟ (Sharp R-311, Japan)

5) เครื่องเขย่าสาร (Vortex G560E, USA.)

6) เครื่องหมุนเหวี่ยง (Kubota 6900, Japan)

7) จานเพาะเชื้อ

8) อุปกรณ์เครื่องแก้ว

9) ช้อนตักสารเคมี

10) ตะไบเหล็ก

11) Steriled centrifuge tube

12) สำลี

3.1.3 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์คุณภาพ

1) pH meter (Schott Model CG-840, Germany)

2) เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง (Sartorius, Germany)

3) เครื่องวัดสี (Minolta CR-10, Japan)

4) อุปกรณ์เครื่องแก้วเพื่อการวิเคราะห์ทางเคมีและจุลชีววิทยา

5) อุปกรณ์ในการทดสอบทางประสาทสัมผัส

PAYAP UNIVERSITY

3.1.4 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1) Sodium hydroxide solution
2) Phenolphthalein indicator
3) Buffer solution (pH 4, 7)
4) Phosphate buffer solution
5) MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) broth
6) MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) agar
7) แอลกอฮอล์ ร้อยละ 70
8) น้ำกลั่น

3.1.5 โปรแกรมประมวลผล

โปรแกรม Microsoft Excel และโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป Statistix version 7 (Analytical Software, Tallahassee)

3.2 วิธีการและแผนการทดลอง

3.2.1 การศึกษาผลิตภัณฑ์แหนมซี่โครงหมูอ่อนต้นแบบ

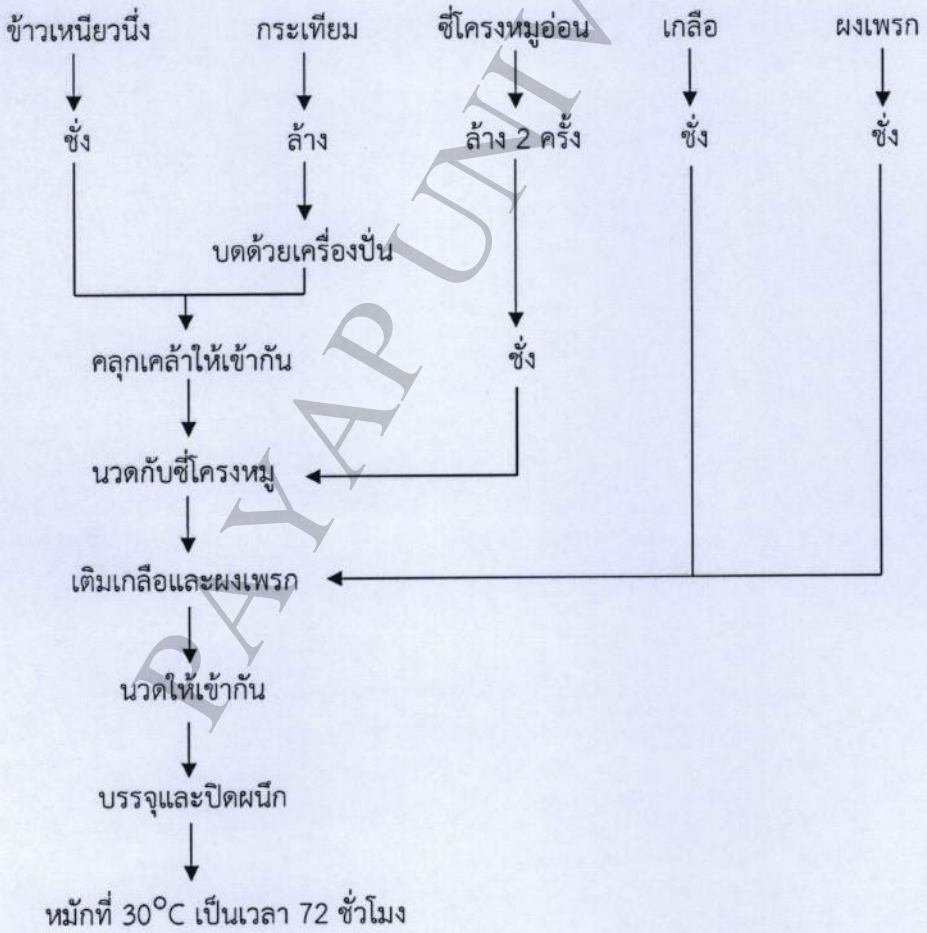
การทดลองนี้จะทำการผลิตแหนมซี่โครงหมูอ่อนต้นแบบ โดยดัดแปลงสูตรและกระบวนการผลิตจาก อำนวย ผู่ตระกูล (2550) และอลิษา ปันนูและมนทกานติ์ บุญยการ (2556) โดยมีส่วนผสมดังนี้

- ซี่โครงหมูอ่อน 1,000 กรัม
- กระเทียม 100 กรัม
- ข้าวเหนียวนึ่ง 30 กรัม
- เกลือ 20 กรัม
- ผงเพรก 0.5 กรัม

PAYAP UNIVERSITY

วิธีการผลิตทำโดยนำข้าวเหนียวนึ่งและกระเทียมบดมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน ผสมซี่โครงหมูอ่อนที่ล้างแล้ว (ขนาด 1 x 1 นิ้ว) กับข้าวเหนียวและกระเทียมที่บดผสมกันแล้ว เติมผงเพรก และเกลือนวดส่วนผสมให้เข้ากัน บรรจุใส่ถุงพลาสติกและปิดผนึกด้วยเครื่องบรรจุสุญญากาศ แล้วนำไปหมักที่อุณหภูมิ 30°C จนผลิตภัณฑ์มี pH < 4.6 กระบวนการผลิตแสดงดังภาพที่ 3.1

นำผลิตภัณฑ์แหนมซี่โครงหมูอ่อนต้นแบบที่ทอดสุกแล้วมาทำการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส ด้วยวิธี 9-point hedonic scale ร่วมกับวิธี 5-point just about right กับผู้ทดสอบชิมจำนวน 50 คน โดยคุณลักษณะที่จะทำการทดสอบได้แก่ สีผลิตภัณฑ์ ขนาดของแหนม กลิ่นรสแหนม รสเปรี้ยว รสเค็ม และความชอบรวม นำผลการทดลองที่ได้ไปหาค่าคะแนนความชอบเฉลี่ย สำหรับสเกลความพอดีจะหาร้อยละความถี่ และ net effect กำหนดเกณฑ์ความพอดีที่ร้อยละ 70 และ net effect ที่ร้อยละ 20 (โสมศิริ สมถวิล และ สุจินดา ศรีวัฒนะ, 2555)



ภาพที่ 3.1 กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์แหนมซี่โครงหมูอ่อนต้นแบบ

PAYAP UNIVERSITY

3.2.2 การศึกษาปริมาณเกลือที่เหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์แหนมซี่โครงหมูอ่อน

การทดลองนี้จะทำการศึกษาปริมาณเกลือ 2 ระดับ คือ ร้อยละ 1.5 และร้อยละ 2.0 ของน้ำหนักซี่โครงหมูอ่อน สูตรผลิตภัณฑ์แหนมซี่โครงหมูอ่อนแสดงดังตารางที่ 3.1 นำผลิตภัณฑ์ไปทำการผลิตโดยใช้กระบวนการผลิตตามภาพที่ 3.1 แต่มีการปรับเพิ่มขนาดของซี่โครงหมูอ่อนเป็น 1.5x1 นิ้ว และมีการล้างซี่โครงหมูอ่อนด้วยน้ำคลอรีนความเข้มข้น 10 ppm รวมถึงปรับวิธีการบรรจุแหนมซี่โครงหมูอ่อนจากการบรรจุและปิดผนึกโดยเครื่องบรรจุสุญญากาศ เป็นการบรรจุด้วยถุงร้อนและใช้ยางรัดรัดถุงให้แน่น บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.1 สูตรแหนมซี่โครงหมูอ่อนที่ผันแปรปริมาณเกลือ

ส่วนผสม	ปริมาณ (กรัม)	
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2
ซี่โครงหมูอ่อน	1,000	1,000
ข้าวเหนียว	100	100
กระเทียม	100	100
เกลือ*	15	20
ผงเพรก	0.5	0.5

หมายเหตุ : *ปริมาณเกลือในสูตรที่ 1 และ 2 คิดเป็นร้อยละ 1.5 และ 2.0 ของน้ำหนักซี่โครงหมู ตามลำดับ

เมื่อหมักครบ 48 ชั่วโมง นำผลิตภัณฑ์แหนมซี่โครงหมูอ่อนทั้ง 2 สูตรมาวัดค่า pH แล้วจึงนำไปทอดให้สุก เพื่อทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-point hedonic scale กับผู้ทดสอบจำนวน 50 คน คุณลักษณะที่ทำการทดสอบได้แก่ สีของผลิตภัณฑ์ กลิ่นรสแหนม รสเปรี้ยว รสเค็ม และความชอบรวม นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป

PAYAP UNIVERSITY

3.2.3 การศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตแหนมซี่โครงหมูอ่อน

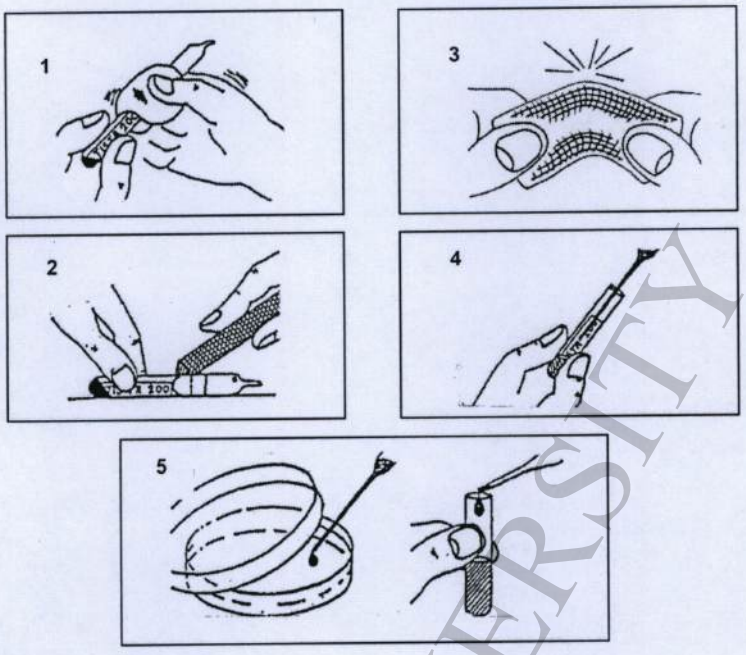
เมื่อได้ปริมาณเกลือที่เหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์แหนมซี่โครงหมูอ่อนจากการทดลองตอนที่ผ่านมา ในการทดลองนี้จะทำการศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตแหนมซี่โครงหมูอ่อนเปรียบเทียบกับสูตรควบคุมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ โดยกล้าเชื้อบริสุทธิ์ที่ใช้มี 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* TISTR 543 และ *Pediococcus acidilactici* TISTR 051 นำกล้าเชื้อบริสุทธิ์ทั้ง 2 สายพันธุ์ไปทำการหมักแหนมซี่โครงหมูอ่อนเปรียบเทียบกับการหมักโดยใช้เชื้อธรรมชาติ โดยมีกระบวนการผลิตดังนี้

1) การเพาะเลี้ยงเชื้อจากเชื้อแห้งแช่แข็ง (Freeze-dried culture)

วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR 543 และ *Pediococcus acidilactici* TISTR 051 จากเชื้อแห้งแช่แข็ง มีวิธีการดังนี้

1. ใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์ 70% เช็ดบริเวณรอบ ๆ หลอดจุลินทรีย์ (ampoule)
2. ใช้ตะไบเหล็ก เลื่อยลงบนหลอดบริเวณกึ่งกลางสำลีให้เป็นรอยลึกลงไปในเนื้อแก้ว
3. ใช้ผ้าที่มีความหนาและสะอาดหุ้มหลอดจุลินทรีย์ และทำการหักหลอดจุลินทรีย์โดยใช้นิ้วหัวแม่มือทั้งสองกดบริเวณด้านตรงข้ามกับรอยเลื่อย
4. ดึงปลายหลอดจุลินทรีย์และสำลีที่อยู่ภายในทิ้งในขวดน้ำยาฆ่าเชื้อ ใช้หลอดหยดดูดอาหาร MRS broth ประมาณ 0.3-0.4 มิลลิลิตร จากปริมาตร 5 มิลลิลิตรถ่ายลงในหลอดจุลินทรีย์ เพื่อละลายเซลล์จุลินทรีย์ในหลอด
5. ดูดสารละลายเซลล์จุลินทรีย์จากหลอดจุลินทรีย์ใส่ลงไปในหลอดอาหาร MRS broth พร้อมกับเขี่ยกระดาษรหัสเชื้อใส่ลงในหลอดอาหารเหลวเดิม จากนั้นหยดสารละลายเซลล์จุลินทรีย์ลงบน MRS agar จำนวน 1 หยด ใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (loop) กระจายเชื้อโดยวิธี streak plate
6. นำ MRS broth และ MRS agar ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

PAYAP UNIVERSITY



ภาพที่ 3.2 วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อจากเชื้อแห้งแช่แข็ง

ที่มา : ดัดแปลงจาก http://www.tistr.or.th/bsd/Download_2.html

2) การเตรียมกล้าเชื้อ

เพาะเชื้อ ในอาหารเหลว MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) broth บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาแยกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ความเร็วรอบ 8,000 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 2 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง จะได้กล้าเชื้อสด

3) การเตรียมวัตถุดิบ

(1) ซี่โครงหมูอ่อน ตัดแต่งให้มีความสูงประมาณ 1.5 นิ้ว และกว้างประมาณ 1 นิ้ว นำไปล้างน้ำสะอาด 1 ครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำคลอรีนความเข้มข้น 10 ppm อีก 1 ครั้ง เพื่อลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น พักให้สะเด็ดน้ำ จึงทำการซับน้ำด้วยผ้าขาวบาง และผ้าขนหนูที่ปราศจากเชื้อ (ภาพที่ ก.2 ในภาคผนวก ก)

PAYAP UNIVERSITY

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยพายัพ 1050036004

(2) กระเทียม คัดเฉพาะกระเทียมที่ไม่เป็นรามาปอกเปลือก แล้วล้างด้วยน้ำคลอรีน 10 ppm จึงบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นที่ผ่านการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำคลอรีน 10 ppm

(3) กล้าเชื้อบริสุทธิ์ ชั่งกล้าเชื้อสด (*Lactobacillus plantarum* TISTR 543 และ *Pediococcus acidilactici* TISTR 051) ร้อยละ 0.015 ของน้ำหนักซี่โครงหมูอ่อน (ดัดแปลงจากปิ่นมณี, 2547)

สูตรแหนมซี่โครงหมูอ่อนทั้ง 3 สูตร แสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สูตรแหนมซี่โครงหมูอ่อนในการศึกษาผลของการใช้เชื้อบริสุทธิ์

ส่วนผสม	ปริมาณ (กรัม)		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3 (Control)
ซี่โครงหมูอ่อน	1,000	1,000	1,000
ข้าวเหนียว	100	100	100
กระเทียม	100	100	100
เกลือ	15	15	20
ผงเพรก	0.5	0.5	0.5
L. plantarum	0.15	-	-
P. acidilactici	-	0.15	-

4) การผสมส่วนผสมและการหมัก

ทำการผลิตแหนมซี่โครงหมูอ่อนตามกระบวนการผลิตดังที่กล่าวมา หมักผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 สูตรที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อตรวจวิเคราะห์คุณภาพดังต่อไปนี้

(1) คุณภาพทางกายภาพ วัดค่าสี L*a*b* (Minolta CR-10)

(2) คุณภาพทางเคมี วัดค่า pH (pH meter) และปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรตได้ (AOAC, 2000)

(3) คุณภาพทางจุลชีววิทยา ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติก

PAYAP UNIVERSITY

เมื่อหมักผลิตภัณฑ์ครบ 48 ชั่วโมง นำผลิตภัณฑ์ไปอบให้สุกด้วยหม้อฝาอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 180°C เวลาประมาณ 20 นาที แล้วนำผลิตภัณฑ์ไปทำการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-point hedonic scale กับผู้ทดสอบจำนวน 50 คน คุณลักษณะที่ทำการทดสอบได้แก่ สีของผลิตภัณฑ์ กลิ่นรสแหนม รสเปรี้ยว รสเค็ม และความชอบรวม นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป

3.2.4 การยืนยันสูตรและกระบวนการผลิตแหนมซี่โครงหมูอ่อน

เมื่อได้สูตรและกระบวนการผลิตแหนมซี่โครงหมูอ่อนที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 3.3.2 และ 3.3.3 แล้ว จะทำการผลิตแหนมซี่โครงหมูอ่อนด้วยสูตรและกระบวนการผลิตดังกล่าว จากนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปอบให้สุกเพื่อนำไปทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วย 9-point hedonic scale ร่วมกับวิธี 5-point just about right กับผู้ทดสอบชิมจำนวน 50 คน คุณลักษณะที่จะทำการทดสอบได้แก่ สีผลิตภัณฑ์ กลิ่นรสแหนม รสเปรี้ยว รสเค็ม และความชอบรวม เพื่อยืนยันสูตรและกระบวนการผลิต หากผลิตภัณฑ์มีคะแนนความชอบเฉลี่ยในทุกคุณลักษณะมากกว่า 7.00 แสดงว่าผู้ทดสอบให้การยอมรับผลิตภัณฑ์ จึงจะทำการทดสอบผู้บริโภคต่อไป

3.2.5 การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค

หลังจากได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นที่ยอมรับของผู้ทดสอบชิมแล้ว ในการทดลองนี้จะทำการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคด้วยวิธีการใช้แบบสอบถามกับผู้บริโภคทั่วไป จำนวน 100 คน โดยแบบสอบถามประกอบด้วยข้อมูล 3 ส่วน ได้แก่ ข้อมูลเกี่ยวกับผู้บริโภค ข้อมูลการทดสอบความชอบและการยอมรับ และข้อมูลเกี่ยวกับการพัฒนาผลิตภัณฑ์แหนมซี่โครงหมูอ่อน ทำการแจกแบบสอบถามพร้อมกับเสิร์ฟผลิตภัณฑ์แหนมซี่โครงหมูอ่อนที่ผ่านการอบให้สุกด้วยหม้อฝาอบลมร้อนให้กับผู้บริโภค นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์และแปลผล

PAYAP UNIVERSITY

3.2.6 การตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์สุดท้าย

ทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์แหนมซี่โครงหมูอ่อนในด้านต่างๆ ดังนี้

1) คุณภาพทางกายภาพ ทำการวัดค่าสี L*, a*, b* (Minolta CR-10)

2) คุณภาพทางเคมี ทำการวัดค่า

   (1) pH (pH meter)

   (2) ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรทได้ (AOAC, 2000)

   (3) ปริมาณ ไนไตรท (In-house method based on AOAC(2012) 973.31)

3) คุณภาพทางจุลชีววิทยา ทำการตรวจวิเคราะห์

   (1) *Escherichia coli* (FDA BAM online, 2002)

   (2) *Salmonella* spp. (ISO6579, 2002)

   (3) *Clostridium perfringens* (FDA BAM online, 2001)

   (4) *Staphylococcus aureus* (FDA BAM online, 2001)

   (5) Yeast and Mold (FDA BAM online, 2001)

หมายเหตุ: การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาจะวิเคราะห์เฉพาะในผลิตภัณฑ์แหนมซี่โครงหมูอ่อนอบ

4) คุณค่าทางโภชนาการ

   (1) วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Proximate analysis) (AOAC, 2000)

   (2) พลังงาน (Compendium of Method for Food analysis, 2003)

หมายเหตุ: การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการจะวิเคราะห์ทั้งในผลิตภัณฑ์แหนมซี่โครงหมูอ่อนดิบและแหนมซี่โครงหมูอ่อนอบ

3.2.7 การถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชน

ทำการถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตแหนมซี่โครงหมูอ่อนให้แก่กลุ่มส่งเสริมอาชีพและกระจายสินค้าเทศบาลตำบลต้นเปา ณ อาคารทดลองแปรรูปอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพายัพ ในวันที่ 23 กรกฎาคม 2557

PAYAP UNIVERSITY