บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัตถุดิบและอุปกรณ์

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์มั่มที่ผลิตโดยเทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

- เนื้อหมูบด
- ตับหมู
- กระเทียม
- ข้าวเหนียว
- ข้าวคั่วบด
- เกลือ
- โซเดียมไนไตรท์ (Sodium nitrite, Food grade, Lap P&P, Thailand)
- ไส้บรรจุเทียมชนิดที่รับประทานได้ (Collagen casing, Nippi casing, Nippi Incorporated, Japan)
- โปแตสเซียมซอร์เบท (Potassium sorbate, Food grade, Lap P&P, Thailand)

อุปกรณ์ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์มั่มที่ผลิตโดยเทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

- เครื่องผสม (Mixer, Kitchen Aid: Model 5K5SS, USA)
- เครื่องอัดไส้ (Stuffer, DICK: HTW-6, Germany)
- เครื่องเตรียมอาหารเอนกประสงค์ (Food Processer, National: MK 5080N, Japan)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator, Heraeus: Model D-6450 Hanau, Germany)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Analytical balance, Mettler-Toledo: Model BB120, Switzerland)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพ

- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH-meter, ORION: Model 520A, USA)
- เครื่องกรองสุญญากาศ (Vaccumm pump, Thomas, USA)
- เครื่องปั่น (Blender, National: MX-T700 GN, Taiwan)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Analytical balance, Mettler-Toledo: Model BB120, Switzerland)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/Visible recording Spectrophotometer, Shimadzu: Model UV-160A, Japan)
- เครื่องวัดค่าน้ำที่เป็นประโยชน์ (a_w-box, Novasina: Model AWC 200. Switzerland)
- ชุดย่อยโปรตีน (Digestion unit, VELP SCIENTIFICA: DK 6.Europe)
- ชุดกลั่นโปรตีน (Distillation unit, FOSS TECATOR: 2100 Kjeltec, Sweden)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert: Model UNB 400. USA)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, Memmert: Model WB14, Germany)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

- เครื่องวัดสี (Chroma Meter, Minolta: Model CR400/410, Japan)
- เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Instron Universal Testing Machine: Model 5565, USA)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา

- เครื่องตีปั่น (Laboratory blender stomacher, Seward Chemical : Model 400, England)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator, Heraeus: Model D-6450 Hanau, Germany)
- หม้อนึ่งความดัน (Autoclave, HIRAYAMA: Model HA 300 MN, Japan)
- เครื่องผสมแบบหมุนวน (Vortex geniez, Sciencetific Industries : Model G-560E, USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส

- ชุดอุปกรณ์ทดสอบชิม
- แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส (รายละเอียดดังภาคผนวก ข)

สารเคมี

- Lactobacilli MRS broth (Difco Laboratories, USA)
- Potato Dextrose Agar (Difco Laboratories, USA)
- Plate Count Agar (Difco Laboratories, USA)
- Lauryl sulphate broth (Difco Laboratories, USA)
- Brilliant green lactose bile broth (Difco Laboratories, USA)
- Eosin Methylene Blue Agar (Difco Laboratories, USA)
- Peptone (Difco Laboratories, USA)
- กรดทาร์ทาริก (Tartaric acid, Merck, Germany)
- แมกนีเซียมไนเตรท (Magnesium nitrate, Merck, Germany)
- โซเดียมไนเตรท (Sodium nitrate, Merck, Germany)
- โปแตสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride, Merck, Germany)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, J.T.Baker,USA)
- เอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 100 (Absolute Ethanol, J.T.Baker,USA)
- กรดเมตาฟอสฟอริก (Metaphosphoric acid, Merck, Germany)
- ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether, LAB-SCAN, Irland)
- ไดเอทธิลอีเทอร์ (Diethyl ether, LAB-SCAN, Irland)
- โซเดียมซัลเฟตปราศจากน้ำ (Sodium sulfate anhydrous, Merck, Germany)
- ซอร์บิคแอซิด โปแตสเซียมซอลท์ (Sorbic acid Potassium salt, Fluka)
- 3,5- ไดไนโตรซาลิไซลิค แอซิด (3,5-Dinitrosalicylic Acid, Fluka)

เครื่องประมวลผลทางสถิติ

- โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft Excel
- โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 10.0.1
- โปรแกรมสำเร็จรูป Mathcad version 7.0 professional
- โปรแกรมสำเร็จรูป Statistica version 5.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

แบ่งการทดลองออกเป็น 7 ตอนดังต่อไปนี้

ตอนที่ 1 : การศึกษาจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการผลิตมั่ม

ทำการแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์มั่มและทำการหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในตระกูล Enterobacteriaceae

1. สุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์มั่มที่มีอายุการเก็บ 2 และ 3 วัน มาทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ Plate Count Agar (PCA) และ Potato Dextrose Agar (PDA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. จากนั้นทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการ Streak plate ในอาหารชนิดเดิม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากข้อ 2. เก็บไว้ในหลอดทดลองที่มีอาหารแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์ไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส
4. สำรวจดูลักษณะ รูปร่าง และคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้

นอกจากนี้ทำการสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์มั่มที่มีอายุการเก็บ 1 , 2 และ 3 วัน มาทำการหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในตระกูล Enterobacteriaceae

ตอนที่ 2 : การศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพมั่มที่ผลิตโดยวิธีพื้นบ้านดั้งเดิมและวิธีใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ตอน ดังนี้

ตอนที่ 2.1 การสร้างเค้าโครงผลิตภัณฑ์มั่ม

ก่อนที่จะทำการพัฒนาผลิตภัณฑ์มั่มนั้น จำเป็นต้องสร้างเค้าโครงผลิตภัณฑ์ เพื่อหาลักษณะที่สำคัญตามความคิดของผู้ทดสอบ ซึ่งวิธีการสร้างเค้าโครงผลิตภัณฑ์นี้สามารถใช้หลักการของ Ideal ratio profile ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Ideal ratio profile test เป็นวิธีการทดสอบเค้าโครงผลิตภัณฑ์เพื่อดูลักษณะด้วยค่าสัดส่วนของผลิตภัณฑ์ ซึ่งเป็นวิธีการที่ให้ผู้ทดสอบแสดงความเข้มหรือความมากน้อยของลักษณะคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสที่มีต่อผลิตภัณฑ์ โดยผู้ทดสอบจะเป็นผู้กำหนดลักษณะของผลิตภัณฑ์เอง ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่กำลังพัฒนามีเค้าโครงลักษณะที่เหมือนหรือคล้ายกับที่ผู้ทดสอบต้องการ โดยเค้าโครงดังกล่าวจะเป็นแนวทางในการเปรียบเทียบกับตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่กำลังพัฒนา

ค่าคะแนนที่ผู้ทดสอบแต่ละคนให้กับลักษณะแต่ละอย่างของผลิตภัณฑ์ จะกำหนดให้เป็นตัวตั้งและหารด้วยค่าคะแนนที่ถูกกำหนดว่าดีที่สุด หรือเป็นคะแนนที่เหมาะสมตรงกับความต้องการของผู้ทดสอบซึ่งจะได้สัดส่วน (Ratio) ของแต่ละคนนำค่าดังกล่าวมาหาค่าเฉลี่ยจะได้ค่าสัดส่วนเฉลี่ย (Mean ratio scores) ค่าสัดส่วนเฉลี่ยที่ได้ของแต่ละลักษณะจะนำมาพิจารณาเปรียบเทียบได้ง่ายกับเค้าโครงลักษณะที่ต้องการซึ่งเป็นค่าสัดส่วนเท่ากับ 1.00 ภาพรวมจากค่าสัดส่วนเฉลี่ยของแต่ละลักษณะเรียกว่า Numerical product profile จากนั้นนำค่าสัดส่วนเฉลี่ยดังกล่าวมาสร้างเป็นเค้าโครงลักษณะรูปวงกลมใยแมงมุม (Cyclic profile)

โดยปกติผลิตภัณฑ์มั่มที่มีการจำหน่ายอยู่ในตลาดปัจจุบันมีทั้งที่ผลิตจากเนื้อวัว และตับวัว กับเนื้อหมูและตับหมู แต่ในการทดลองและงานวิจัยนี้ใช้เนื้อหมูและตับหมู เพราะนอกจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในตลาดปัจจุบันแล้ว ผู้บริโภคยังมีแนวโน้มในการบริโภคผลิตภัณฑ์จากเนื้อวัวลดลง ประกอบกับผลิตภัณฑ์จากเนื้อหมูมีการบริโภคที่แพร่หลายกว่า ดังนั้นจึงทำการศึกษาผลิตภัณฑ์มั่มจากเนื้อหมูและตับหมูแทน

สูตรพื้นฐานของผลิตภัณฑ์มั่มที่ผลิตโดยเทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

ตาราง 3.1 สูตรพื้นฐานของการผลิตมั่ม

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ร้อยละของเนื้อหมู*)
กระเทียม	10.00
ข้าวคั่วบด	5.00
เกลือ	3.00
ข้าวเหนียวสุก	5.00
โซเดียมไนไตรท์	0.02
เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น	0 log cfu/g

หมายเหตุ * ส่วนผสมหลัก ประกอบด้วย เนื้อหมูร้อยละ 100 ตับหมู ร้อยละ 20 (ของเนื้อหมู)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมวัตถุดิบ

- **เนื้อหมู** เป็นเนื้อส่วนสะโพกและแยกเอาส่วนมันออก แล้วบดให้ละเอียด
- **ตับหมู** นำตับหมูมาต้มให้สุกแล้วบดให้ละเอียด
- **กระเทียม** นำมาปอกเปลือกออก แล้วตัดแต่งส่วนที่ไม่ต้องการออกเช่นหัวกระเทียม แล้วนำมาบดสับให้ละเอียด
- **ข้าวเหนียวสุก** นำมาล้างด้วยน้ำสะอาดจนหมดเมือก
- **ส่วนประกอบอื่นๆ** (เกลือ ข้าวคั่วบด โซเดียมไนไตรท์ ชั่งน้ำหนักตามสูตรของการผลิต)

กระบวนการผลิตมั่ม มีดังต่อไปนี้

นำหมูที่บดแล้วมาผสมกับตับที่ต้มและบดแล้วเข้าด้วยกัน เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นค่อยๆเติมเกลือที่มีการผสมโซเดียมไนไตรท์แล้วลงไปและผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที เติมข้าวเหนียวที่บดละเอียดพร้อมกับกระเทียมลงไป ผสมเป็นเวลา 1 นาที เติมข้าวคั่วบดลงไปในส่วนผสมอีกครั้งแล้วผสมอีก 1 นาที นำเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นที่เตรียมไว้ เติมลงไปตามอัตราส่วนแล้วผสมนาน 1 นาที

นำส่วนผสมทั้งหมดที่ผ่านการนวด และมีความเหนียวได้ที่แล้ว (ส่วนผสมจับกันเป็นก้อนรวมกัน) มาอัดบรรจุด้วยเครื่องอัดไส้ (Stuffer) ลงในไส้ชนิดคอลลาเจนที่เตรียมไว้ จากนั้นมัดไส้ที่ผ่านการอัดส่วนผสมออกมาเป็นปล้องๆให้มีความยาวเท่าๆกันทุกอัน โดยกำหนดให้มีขนาดความยาว 15 เซนติเมตร นำส่วนผสมที่ผ่านการอัดไส้และมัดเป็นปล้องแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตอนที่ 2.2 การเปรียบเทียบคุณภาพมั่มที่ผลิตโดยวิธีพื้นบ้านกับการผลิตโดยใช้เทคโนโลยี เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

ในขั้นตอนนี้ได้วางแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman Design (ไพโรจน์, 2547(b)) เพื่อกลั่นกรองปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์มั่ม โดยกำหนดให้ส่วนผสมหลัก คือ เนื้อหมูและตับหมู อัตราส่วน 10 : 2 และมีปัจจัยที่คาดว่ามีผลกระทบต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์ดังนี้

ตาราง 3.2 ระดับของปัจจัยที่คาดว่ามีผลกระทบต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์มั่ม

ปัจจัย	ระดับปัจจัย (ร้อยละของส่วนผสมหลัก)	
	ระดับต่ำ(-)	ระดับสูง(+)
A กระเทียม	10	20
B ข้าวคั่วบด	1	5
C เกลือ	2	4
D ข้าวเหนียวสุก	5	10
E โซเดียมไนไตรท์	0.010	0.015
F เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น	0 log cfu/g	6 log cfu/g

หมายเหตุ เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นที่ใช้ คือ เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นที่ได้จากการทดลองตอนที่ 1

ตาราง 3.3 แผนการทดลองแบบ Plackett and Burman Design (N=12) ในการกลั่นกรองปัจจัยที่สำคัญของสูตรการผลิตมั่ม

สิ่งทดลอง	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
2	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
3	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
4	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
5	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
6	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
7	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
8	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
9	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
10	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
11	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ A – F คือ ปัจจัยต่าง ๆ ในสูตรการผลิต, G และ K คือ Dummy variables

- คือ ระดับต่ำ และ + คือ ระดับสูง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อได้ตัวอย่างจากสิ่งทดลองทั้งหมด 12 ตัวอย่าง จะดำเนินการตรวจสอบวิเคราะห์คุณภาพทางด้านเคมี กายภาพ รวมทั้งการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส

บันทึกข้อมูลที่ได้ทั้งหมดและนำมาวิเคราะห์ทางด้านสถิติ เพื่อกลั่นกรองหาปัจจัยสำคัญที่กระทบต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ซึ่งข้อมูลที่ได้ในการทดลองนี้จะทำให้ทราบถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นกับการไม่ใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธ์เริ่มต้น (วิธีดั้งเดิม) ว่ามีความแตกต่างกันอย่างไร

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านเคมี

- ความเป็นกรดเป็นด่าง (AOAC,2000)
- ปริมาณความเป็นกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแลคติค (AOAC, 2000)

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านกายภาพ

- ค่าแรงเฉือน (Instron, 1993)

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส

- ใช้ Ideal ratio profile technique (ไพโรจน์, 2545)

ตอนที่ 3: การศึกษาสูตรและปริมาณเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตมั่ม

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ตอน ดังนี้

ตอนที่ 3.1 การศึกษาปัจจัยด้านสูตรการผลิตที่สำคัญที่มีผลกระทบต่อคุณภาพของมั่มโดยเทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

การทดลองนี้เป็นการวางแผนการทดลองแบบ 2^K Factorial Experimental in Central Composite Design ซึ่ง K คือ ปัจจัยสำคัญหรือปัจจัยหลักที่มีผลกระทบต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์มั่ม เพื่อทำการศึกษาระดับหรือปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งในการทดลองนี้คือ เกลือ และโซเดียมไนไตรท์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ดังนั้นแผนการทดลองแบบ 2^2 Factorial Experimental in Central Composite Design นี้ได้มีการกำหนดปัจจัย เกลือ และโซเดียมไนไตรท์ ออกเป็น 5 ระดับ คือ ระดับต่ำสุด ($-\alpha$) ระดับต่ำ (-1) ระดับกึ่งกลาง (0) ระดับสูง (+1) ระดับสูงสุด ($+\alpha$)

ระดับกึ่งกลางคำนวณจาก

ระดับกึ่งกลาง = (ระดับสูง+ระดับต่ำ) / 2

คุณลักษณะ α สามารถคำนวณได้จาก

$\alpha = \pm 2^{(K-P)/4}$

โดยที่ K คือ จำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษา

P คือ Fractionilzation elements ในที่นี้ให้เท่ากับ 0

ในการทดลองนี้มีปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย ดังนั้นจะได้

$\alpha = \pm 2^{(2-0)/4}$

$\alpha = \pm 1.414$

ดังนั้นระดับสูงสุดและต่ำสุดคือ $\pm\alpha = \pm 1.414$

ระดับต่ำ (-1) หาได้จากสูตร

ระดับต่ำ (-1) = ระดับกึ่งกลาง – $\frac{\text{ผลต่างของระดับกึ่งกลางและระดับต่ำสุด}}{\alpha}$

ระดับสูง(+1) = ระดับกึ่งกลาง + $\frac{\text{ผลต่างของระดับกึ่งกลางและระดับสูงสุด}}{\alpha}$

จากสูตรการคำนวณทำให้ได้รับต่างๆของปัจจัยที่ต้องการศึกษาดังนี้

ปัจจัย A คือ เกลือ โดยมีการให้ระดับเกลือที่ร้อยละ 1 - 2

- ระดับกึ่งกลางของเกลือ (0) เท่ากับ ร้อยละ (2+1) / 2 = 1.5
- ระดับต่ำสุดของเกลือ ($-\alpha$a) เท่ากับ ร้อยละ 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- ระดับสูงสุดของเกลือ (+αa) เท่ากับ ร้อยละ 2
- ระดับต่ำของเกลือเท่ากับ ร้อยละ 1.5 – [(1.5-1) / 1.414] = 1.15
- ระดับสูงของเกลือเท่ากับ ร้อยละ 1.5 + [(2-1.5) / 1.414] = 1.85

ส่วนปัจจัย B คือ โซเดียมไนไตรท์ โดยมีการให้ระดับที่ 75 – 125 ppm โดยคำนวณได้เช่นกัน ซึ่งสามารถสรุประดับต่างๆของเกลือ และโซเดียมไนไตรท์ได้ดังตาราง 3.4 และแผนการทดลองดังตาราง 3.5

ตาราง 3.4 ปริมาณของเกลือ และโซเดียมไนไตรท์ ที่ใช้ในระดับต่างๆ

ปัจจัย/ระดับ	(- α)	(-1)	(0)	(+1)	(+ α)
A: เกลือ (ร้อยละ)	1	1.15	1.5	1.85	2
B: โซเดียมไนไตรท์ (ppm)	75	82	100	118	125

ตาราง 3.5 แสดงแผนการทดลองแบบ 2^2 Factorial Experimental in Central Composite Design

สิ่งทดลองที่		เกลือ (ร้อยละ)	โซเดียมไนไตรท์ (ppm)
1	(1)	1.15	82
2	(a)	1.85	82
3	(b)	1.15	118
4	(ab)	1.85	118
5	(-αa)	1.00	100
6	(+αa)	2.00	100
7	(-αb)	1.50	75
8	(+αb)	1.50	125
9	(cp 1)	1.50	100
10	(cp 2)	1.50	100
11	(cp 3)	1.50	100

หมายเหตุ -α คือ ระดับต่ำสุด +α คือ ระดับสูงสุด (1) คือ ควบคุม
a คือ เกลือ b คือ โซเดียมไนไตรท์ cp คือ ระดับของจุดกึ่งกลางในแต่ละปัจจัย

เมื่อได้ตัวอย่างทดลองทั้งหมดแล้ว ดำเนินการตรวจสอบวิเคราะห์คุณภาพดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านเคมี

- ความเป็นกรดเป็นด่าง (AOAC, 2000)
- ปริมาณความเป็นกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแลคติค (AOAC, 2000)

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านกายภาพ

- ค่าสี L, a และ b (Minolta camera, Chroma Meter CR – 310, Japan.)
- ค่าแรงเฉือน (Instron, 1993)

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส

- ใช้ Ideal ratio profile technique (ไพโรจน์, 2545)

ตอนที่ 3.2 การศึกษาปริมาณเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตมั่ม

ขั้นตอนนี้จะทำการศึกษาปริมาณของเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นที่ใช้ในการผลิตมั่ม โดยจะใช้ข้อมูลในตอนที่ 2.2 เป็นฐานข้อมูล ซึ่งใช้ปริมาณ 6 log cfu/g ในขั้นตอนนี้จะผันแปรปริมาณเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในช่วง 4 – 6 log cfu/g

เมื่อได้ตัวอย่างทดลองทั้งหมด จะดำเนินการตรวจสอบวิเคราะห์คุณภาพดังนี้

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านเคมี

- ความเป็นกรดเป็นด่าง (AOAC, 2000)
- ปริมาณความเป็นกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแลคติค (AOAC, 2000)

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านกายภาพ

- ค่าสี L, a และ b (Minolta camera, Chroma Meter CR – 310, Japan.)
- ค่าแรงเฉือน (Instron, 1993)

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส

- ใช้ Ideal ratio profile technique (ไพโรจน์, 2545)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตอนที่ 4: การศึกษากระบวนการผลิตที่เหมาะสมของมั่มที่ใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

ในขั้นตอนนี้จะศึกษากระบวนการหมักมั่ม โดยจะใช้สูตร และปริมาณเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองตอนที่ 3 มาทำการผลิตและหมักที่สภาวะที่กำหนด คือ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยจะผันแปรเวลาที่ใช้ในการหมักคือ 48, 60 และ72 ชั่วโมง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตมั่ม โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) (ไพโรจน์, 2547(a))

เมื่อได้ตัวอย่างทดลองทั้งหมดแล้ว จะดำเนินการตรวจสอบวิเคราะห์คุณภาพดังนี้

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านเคมี

- ความเป็นกรดเป็นด่าง (AOAC, 2000)
- ปริมาณความเป็นกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแลคติค (AOAC, 2000)

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านกายภาพ

- ค่าสี L, a และ b (Minolta camera, Chroma Meter CR – 310, Japan.)
- ค่าแรงเฉือน (Instron, 1993)

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส

- ใช้ Ideal ratio profile technique (ไพโรจน์, 2545)

ตอนที่ 5: การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สุดท้าย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5.1 ทำการสรุปสูตร และกรรมวิธีการผลิตที่เหมาะสมจากการทดลองตอนที่ 2-4

5.2 ทำการผลิตมั่มโดยใช้ผลสรุปจากข้อ 4

5.3 ตรวจสอบวิเคราะห์คุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ดังนี้

5.3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางด้านเคมีโดยประมาณ

- โปรตีน (AOAC, 2000)
- ไขมัน (AOAC, 2000)

- คาร์โบไฮเดรต AOAC, 2000)
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (AOAC, 2000)
- ปริมาณน้ำ (AOAC, 2000)
- ความเป็นกรดเป็นด่าง (AOAC, 2000)
- ปริมาณความเป็นกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแลคติค (AOAC, 2000)

5.3.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านกายภาพ

- ค่าสี L, a และ b (Minolta camera, Chroma Meter CR – 310, Japan.)
- ค่าแรงเฉือน (Instron, 1993)

5.3.3 การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์

- ปริมาณยีสต์และรา (AOAC, 2000)
- ปริมาณ Lactic acid bacteria (AOAC, 2000)
- ปริมาณ Enterobacteriaceae (AOAC, 2000)

5.3.4 การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส

- ใช้ Ideal ratio profile technique (ไพโรจน์, 2545)

ตอนที่ 6: การศึกษา Sorption isotherm ของผลิตภัณฑ์มั่มที่ผลิตโดยเทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

ขั้นตอนการศึกษา Sorption isotherm เป็นการศึกษาปริมาณน้ำอิสระในอาหารของผลิตภัณฑ์มั่ม เนื่องจากคุณลักษณะดังกล่าวเป็นปัจจัยที่สำคัญส่วนหนึ่งที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียโดยจุลินทรีย์ต่างชนิด หรือทำให้เกิดการเน่าเสียในลักษณะต่างๆ รวมทั้งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี และกายภาพในผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการศึกษาคุณลักษณะของน้ำอิสระในอาหารจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในอาหารชนิดแห้งหรือกึ่งแห้ง เพื่อกำหนดสภาวะหรือควบคุมสภาวะในการเก็บผลิตภัณฑ์ให้มีความเหมาะสม

นำเอากระดาษกรองเบอร์ 42 ที่ผ่านการทำแห้งแล้วมาเก็บในภาชนะพลาสติก (Mini-desiccator) หรือ Proximity Equilibration Cells (PEC) ที่มีสารละลายเกลืออิ่มตัวแต่ละชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ซึ่งจะมีความชื้นสัมพัทธ์สมดุลของสารละลายเกลืออิ่มตัวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสแตกต่างกัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนักกระดาษกรอง

จากนั้นนำตัวอย่างมั่มที่ผ่านกระบวนการหมักเป็นเวลา 2 วันมาสุ่มตัวอย่างแล้วชั่งน้ำหนักของตัวอย่างประมาณ 1-2 กรัม และนำมาใส่ในภาชนะพลาสติกบนกระดาษกรอง นำตัวอย่างมั่มทิ้งไว้ในภาชนะดังกล่าวเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จึงนำกระดาษกรอง พร้อมทั้งตัวอย่างมาชั่งหาน้ำหนักเพื่อหาปริมาณน้ำ (กรัมน้ำต่อกรัมของแข็ง) ที่เปลี่ยนแปลงไป โดยจะทำการทดลองเช่นเดียวกันนี้ 3 ครั้ง แล้วนำไปคำนวณแล้วสร้างกราฟหาความสัมพันธ์กับ a_w ก็จะได้กราฟของ Sorption isotherm (ไพโรจน์, 2547(c)) โดยในการทดลองนี้จะมีการหาคุณลักษณะที่มีความสัมพันธ์กับการทำ Sorption isotherm ด้วยคือการหาคุณลักษณะปริมาณน้ำ (AOAC,2000) และคุณลักษณะปริมาณน้ำอิสระในอาหาร (a_w) (Novasina, a_w -box ; AWC 200, Switzerland)

ตอนที่ 7: การศึกษาการใช้สารเคมีและการบรรจุเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์มั่ม ที่ผลิตโดยเทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ตอน ดังนี้

ตอนที่ 7.1 ศึกษาปริมาณและวิธีการใช้สารเคมียืดอายุการเก็บรักษาที่เหมาะสมต่อผลิตภัณฑ์มั่มที่ผลิตโดยเทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

ในการศึกษาอายุการเก็บผลิตภัณฑ์มั่มนั้น ทำโดยนำมั่มที่ได้จากการทดลองที่ 4 มาแช่ลงในสารเคมีกันเชื้อราหรือสารละลายโปแตสเซียมซอร์เบทตามความเข้มข้นและระยะเวลาที่ต่าง ๆ กัน โดยมีวางแผนการทดลองแบบ 2^2 Factorial Experiment in Central Composite Design (ไพโรจน์, 2547(a)) แล้วนำผลิตภัณฑ์มั่มที่ผ่านการแช่สารละลายโปแตสเซียมซอร์เบทไปหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาการหมักที่ได้จากการทดลอง ซึ่งหลังจากการครบระยะเวลาการหมักแล้วจึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดซอร์บิค (AOAC ,2000) นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของสารละลายโปแตสเซียมซอร์เบทและระยะเวลาในการแช่ผลิตภัณฑ์ลงในสารละลายที่เหมาะสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการทดลองใช้ปริมาณความเข้มข้นของสารละลายโปแตสเซียมซอร์เบทและเวลาในการแช่ผลิตภัณฑ์ลงในสารละลายดังกล่าวที่เหมาะสม จะมีการวางแผนการทดลองแบบ 2^2 Factorial Experiment in Central Composite Design ซึ่งแต่ละปัจจัยจะมีอยู่ 5 ระดับคือ ระดับสูงสุด ($+\alpha$) ระดับสูง (+1) ระดับกลาง (0) ระดับต่ำ (-1) และระดับต่ำสุด ($-\alpha$) เมื่อกำหนดให้ α มีค่าเท่ากับ 1.414 โดยวิธีการคำนวณจะใช้วิธีการดังนี้ระดับกึ่งกลางคำนวณจาก

ระดับกึ่งกลาง = (ระดับสูง+ระดับต่ำ) / 2

ค่า α สามารถคำนวณได้จาก

$\alpha = \pm 2^{(k-P)/4}$

โดยที่ k คือ จำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษา

P คือ Fractionilzation elements ในที่นี้ให้เท่ากับ 0

ในการทดลองนี้มีปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย ดังนั้นจะได้

$\alpha = \pm 2^{(2-0)/4}$

$\alpha = \pm 1.414$

ดังนั้นระดับสูงสุดและต่ำสุดคือ $\pm\alpha = \pm 1.414$

ระดับต่ำ (-1) หาได้จากสูตร

$$\text{ระดับต่ำ (-1)} = \text{ระดับกึ่งกลาง} - \frac{\text{ผลต่างของระดับกึ่งกลางและระดับต่ำสุด}}{\alpha}$$

$$\text{ระดับสูง (+1)} = \text{ระดับกึ่งกลาง} + \frac{\text{ผลต่างของระดับกึ่งกลางและระดับสูงสุด}}{\alpha}$$

จากสูตรการคำนวณทำให้ได้รับต่างๆของปัจจัยที่ต้องการศึกษาดังนี้

ปัจจัย A คือ โปแตสเซียมซอร์เบท โดยมีการให้ระดับที่ร้อยละ 2 - 10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- ระดับกึ่งกลางของโปแตสเซียมซอร์เบท (0) เท่ากับ ร้อยละ (10+2) / 2 = 6.00
- ระดับต่ำสุดของโปแตสเซียมซอร์เบท (-αa) เท่ากับ ร้อยละ 2.00
- ระดับสูงสุดของโปแตสเซียมซอร์เบท (+αa) เท่ากับ ร้อยละ 10.00
- ระดับต่ำของโปแตสเซียมซอร์เบทเท่ากับ ร้อยละ 6.00 – [(6.00 – 2.00) / 1.414] = 3.17
- ระดับสูงของโปแตสเซียมซอร์เบทเท่ากับ ร้อยละ 6.00 + [(10.00 – 6.00) / 1.414] = 8.83

ส่วนปัจจัย B คือ เวลาในการแช่ผลิตภัณฑ์ (นาที) โดยมีการให้ระดับที่ 1 – 2 นาทีโดยคำนวณได้เช่นกัน ซึ่งสามารถสรุประดับต่างๆของโปแตสเซียมซอร์เบทกับเวลาที่ใช้ในการแช่ได้ดังตาราง 3.6

ตาราง 3.6 ปริมาณความเข้มข้นของสารละลายโปแตสเซียมซอร์เบทกับเวลาที่ใช้ในการแช่ผลิตภัณฑ์ที่ระดับต่างๆ

ปัจจัย/ระดับ	(- α)	(-1)	(0)	(+1)	(+ α)
A	2.00	3.17	6.00	8.83	10.00
B	1.00	1.15	1.50	1.85	2.00

หมายเหตุ A คือ ความเข้มข้นของโปแตสเซียมซอร์เบท (ร้อยละ)
B คือ เวลาที่ใช้ในการแช่ (นาที)

โดยมีแผนการทดลองดังตาราง 3.7

ตาราง 3.7 แผนการทดลองแบบ 2^2 Factorial Experiment in Central Composite Design ในการศึกษาสารกันเชื้อราในผลิตภัณฑ์มั่ม

สิ่งทดลอง	ความเข้มข้นโปแตสเซียมซอร์เบท (ร้อยละ)	เวลาในการแช่ (นาที)
(1)	3.17	1.15
a	8.82	1.85
b	3.17	1.15
ab	8.82	1.85
-αa	2.00	1.50
+αa	10.00	1.50
-αb	6.00	1.00
+αb	6.00	2.00
cp_1	6.00	1.50
cp_2	6.00	1.50
cp_3	6.00	1.50
control	0.00	0.00

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กำหนดให้ ปัจจัย A คือ ความเข้มข้นของโปแตสเซียมซอร์เบท (ร้อยละ)

ปัจจัย B คือ เวลาในการแช่ (นาที)

หมายเหตุ + คือ ระดับสูง - คือ ระดับต่ำ

a คือ โปแตสเซียมซอร์เบท b คือ เวลาในการแช่

(1) คือ ควบคุม(ที่ใช้เวลาและปริมาณสารต่ำสุด) cp คือ จุดกึ่งกลางระดับของแต่ละปัจจัยปัจจัย

control คือ สิ่งทดลองที่ไม่ใช้โปแตสเซียมซอร์เบท

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านเคมี

- การวิเคราะห์ปริมาณโปแตสเซียมซอร์เบทในรูปกรดซอร์บิค (AOAC, 2000)

ตอนที่ 7.2 ศึกษาผลของสภาวะและวิธีการบรรจุต่ออายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์มั่มที่ผลิตโดยเทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

การทดลองที่ 7.1 ทำให้ทราบปริมาณความเข้มข้นของสารละลายโปแตสเซียมซอร์เบทและเวลาที่เหมาะสมในการใช้แช่ผลิตภัณฑ์ จากนั้นทำการศึกษาผลของการใช้สารละลายโปแตสเซียมซอร์เบท และสภาวะความชื้นสัมพัทธ์ที่ฤดูกาลต่างๆต่ออายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์มั่ม โดยในการทดลองจะเป็นการเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์มั่มที่มีการควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ ที่ฤดูกาลต่างๆ ซึ่งจะทำการจำลองความชื้นสัมพัทธ์ให้มีความแตกต่างกัน 3 สภาวะ โดยมีการกำหนดความชื้นสัมพัทธ์ด้วยการใช้สารละลายเกลืออิ่มตัวแต่ละชนิดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นตัวควบคุมความชื้นสัมพัทธ์

ตาราง 3.8 ความชื้นสัมพัทธ์ของเกลือชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ชื่อสารเคมี	ความชื้นสัมพัทธ์ (ร้อยละ)
Magnesium nitrate	51.40±0.24 หรือประมาณร้อยละ 51
Sodium nitrate	73.14±0.31 หรือประมาณร้อยละ73
Potassium chloride	83.63±0.25 หรือประมาณร้อยละ84

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.9 แผนการทดลองที่ใช้ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์มั่มที่ผลิตโดยเทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

สิ่งทดลอง	สภาวะการเก็บรักษา	สารละลายโปแตสเซียมซอร์เบท
1	บรรจุในถุงชนิดป้องกันการแลกเปลี่ยนความชื้น	ไม่แช่สารละลาย
2	บรรจุในถุงชนิดป้องกันการแลกเปลี่ยนความชื้น	แช่สารละลาย
3	เก็บไว้ที่ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ84	ไม่แช่สารละลาย
4	เก็บไว้ที่ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ84	แช่สารละลาย
5	เก็บไว้ที่ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ51	ไม่แช่สารละลาย
6	เก็บไว้ที่ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ51	แช่สารละลาย
7	เก็บไว้ที่ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 73	ไม่แช่สารละลาย
8	เก็บไว้ที่ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 73	แช่สารละลาย

เมื่อได้ตัวอย่างทดลองมา จะดำเนินการตรวจสอบวิเคราะห์คุณภาพดังนี้

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านเคมี

- ความเป็นกรดเป็นด่าง (AOAC, 2000)
- ปริมาณความเป็นกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแลคติค (AOAC, 2000)
- ค่า Thiobarbituric acid number (TBA) (Pearson, 1981)
- ปริมาณซอร์เบทที่เหลือ (AOAC ,2000)

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านกายภาพ

- ค่าสี L, a และ b (Minolta camera, Chroma Meter CR – 310, Japan.)
- ค่าแรงเฉือน (Instron, 1993)

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์

- ปริมาณยีสต์และรา (AOAC, 2000)

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส

- ใช้ Ideal ratio profile technique (ไพโรจน์, 2545)

ต้นทุนการผลิต

คำนวณต้นทุนผลิตภัณฑ์มั่มที่ผลิตโดยเทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นซึ่งมีการใช้สูตรและกระบวนการผลิตที่เหมาะสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved