บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

1. เศษเนื้อนกกระจอกเทศ (นนธนา ฟาร์มนกกระจอกเทศ, เชียงใหม่, ประเทศไทย)
2. โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต (Sodium Tripolyphosphate : Lab P&D ,Thailand.)
3. โปรตีนถั่วเหลืองสกัด (Soy protein isolate : บริษัท ฟู้ด อีคิว จำกัด, ประเทศไทย)
4. กลูเตน (Gluten : ร้านมายด์แอนแคร์โปรดักซ์, เชียงใหม่, ประเทศไทย)
5. ไส้ไฟบรัส (Fibrous : ร้านมายด์แอนแคร์โปรดักซ์, เชียงใหม่, ประเทศไทย)
6. เกลือ (ตราปรุงทิพย์ บริษัทอุตสาหกรรมเกลือบริสุทธิ์ จำกัด, นครราชสีมา, ประเทศไทย)

3.1.2 สารเคมี

1. กรดซัลฟูริค (Sulfuric acid : Merck, Germany)
2. กรดบอริค (Boric acid : Merck, Germany)
3. คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate : Merck, Germany)
4. ซิลิเนียมไดออกไซด์ (Selenium dioxide : J.T.Baker, USA)
5. โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulfate : Merck, Germany)
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide : J.T.Baker, USA)
7. โบรโมครีซอลกรีน (Bromocresol green : Fluka, Switzerland)
8. เมธิลีนบลู (Methylene blue : Scientific, U.K.)
9. เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol : Meark, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10. ไดเอทิล อีเทอร์ (Diethyl Ether : LAB-SCAN, Ireland)
11. ไกลซีน (Glycine : Ajax Finechem, Australia)
12. โบรโมฟีนอล บลู (Bromophenol blue : Life Science, Austria)
13. ทริส (Tris : Buckinghamshire, England)
14. เมอร์เคปโทเมทานอล (2-mercaptoethanol : Merck, Germany)
15. โซเดียม โดดีไซซัลเฟต (Sodium dodecylsulfate : Sigma chemical, USA)
16. โคแมสซี บริลเลี่ยน บลู 250 (Coomassie brilliant blue R250 : Sigma chemical, USA)
17. แอมโมเนียม เปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate : Pharmacia biotech, Sweden)
18. เมทธีลีน บริส อะคลาลามัย (N,N-methylene-bis acrylamide : Pharmacia biotech, Sweden)
19. เท็มเม็ท (TEMED : Pharmacia biotech, Sweden)
20. เมทานอล (Methanol : Merck, Germany)
21. ไฮโดรคลอริค แอซิด (Hydrochloric acid : BDH Laboratory, England)
22. กลีเซอรอล (Glycerol :May & Baker LTD. Dagehn, ENGLAND)
23. อะซิติก แอซิด (Acetic acid : Merck, Germany)

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตเศษเนื้อนกกระจอกเทศขึ้นรูป

1. เครื่องผสม (Kitchen Aid model 5K5SS, USA)
2. เครื่องอัดขึ้นรูปแบบไฮโดรลิค (ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, ประเทศไทย)
3. เครื่องหั่นเนื้อ (Slicer ; HW-961, Taiwan)

3.2.2 อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์ทางกายภาพ

1. เครื่องมือวิเคราะห์เนื้อสัมผัส (Texture Analyzer TA-XT Plus, Stable Micro System, England)
2. เครื่องสำหรับวัด Differential Scanning Calorimetry (DSC : Q100V6.16 build224)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.3 อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์ทางเคมี

3. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance ; Sartorius : Model A120S, Germany)
4. เครื่องย่อยสำหรับวิเคราะห์โปรตีน (Tecator, Sweden)
5. เครื่องกลั่นโปรตีน (2100 Kjetec Distillation Unit ; Foss Tecator, Sweden)
6. เตาเผาเถ้า (Muffle Furnace ; Gallenkamp, England)
7. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven ; Termaks : Model T111UV, Bergen-Norway)
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath ; Gallenkamp, England)
9. ชุดวิเคราะห์โปรตีน/ไนโตรเจนทั้งหมด ด้วยวิธีเคลดาห์ล (Kjeldahl Method)
10. ตู้อบแบบสญญากาศ (Vacuum oven ; WPB Binder : VD23)
11. ชุดสกัดไขมัน (Soxhlet extration apparatus)
12. ตู้ดูดควัน (Hood ; Hoefer Pharmacia Biotech, Bangkok)
13. ชุดสำหรับทำอิเลคโทรโฟรีซีส mini vertical Hoefer apparatus (Hoefer Pharmacia Biotech Inc, Sweden)
14. เครื่องแก้วต่าง ๆ

3.3 เครื่องมือที่ใช้ประมวลผลข้อมูลทางสถิติ

1. เครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล (Personal computer)
2. โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft Excel
3. โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 10.0.1
4. โปรแกรมสำเร็จรูป STATISICA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมตัวอย่างเศษเนื้อนกกระจอกเทศขึ้นรูป

การเตรียมไส้ไฟบรัส : ใช้ไส้บรรจุชนิดไฟบรัส (Fibrous) ซึ่งมีลักษณะเป็นถุงทรงกระบอกหัวท้ายเปิด เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 นิ้ว ยาวประมาณ 20 นิ้ว ก่อนใช้บรรจุ ให้นำไปแช่ในน้ำสะอาดอย่างน้อย 3 นาที เพื่อให้ไส้อ่อนตัว จากนั้นจึงนำมามัดปากถุงด้านหนึ่งด้วยเชือกชนิดที่ใช้สำหรับมัดไส้กรอก โดยจับจีบปากถุงที่จะมัดให้เป็นรูปพัด แล้วจึงมัดให้แน่น เตรียมใช้บรรจุต่อไป

การเตรียมเนื้อ : นำเศษเนื้อนกกระจอกเทศมาตัดแต่งเอาเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ไขมัน และเอ็นออก จากนั้นตัดเนื้อตามแนวยาวของเส้นใยกล้ามเนื้อแล้วหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1x1x1 เซนติเมตร จากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้ชิ้นเนื้อยึดเกาะได้ได้มากขึ้น

รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเพื่อผลิตเศษเนื้อนกกระจอกเทศขึ้นรูป

ที่มา : ชวัชชัย (2537)

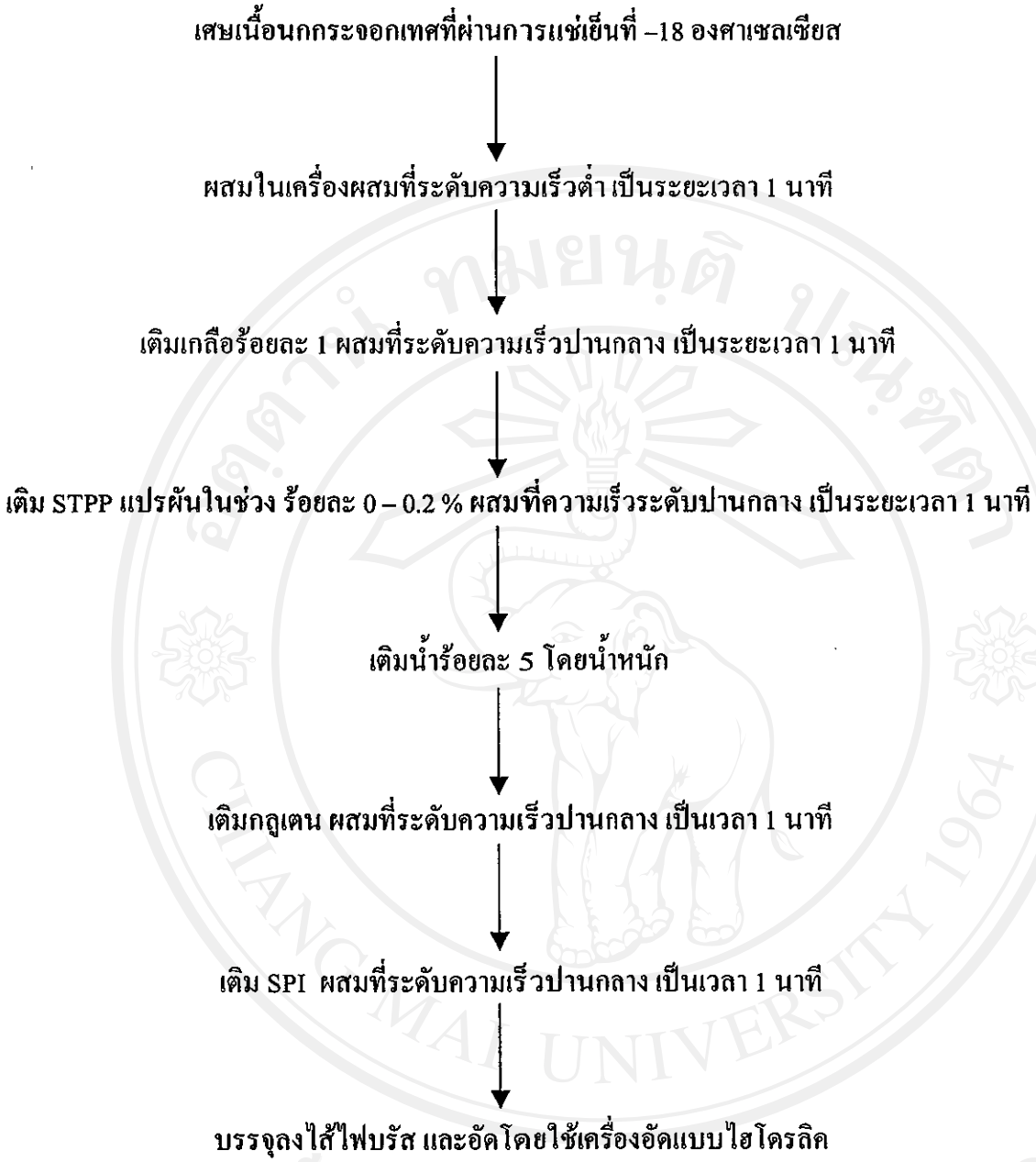
วิธีผลิตเนื้อขึ้นรูป : นำเนื้อที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อมานวดผสม (Kitchen acid) โดยใช้เครื่องนวดผสมที่ระดับความเร็วระดับต่ำ เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้เศษเนื้อกระจายตัวออกจากกันไม่ติดเป็นก้อน จากนั้นเติมเกลือร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ผสมที่ความเร็วระดับปานกลาง เป็นเวลา 1 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยค่อย ๆ เติมเกลือทีละน้อยในช่วงระยะเวลาของการผสม แล้วเติม STPP ทีละน้อยในช่วงเวลาของการผสม ผันแปรปริมาณร้อยละ 0-0.2 โดยน้ำหนัก โดยค่อย ๆ เติมทีละน้อยในช่วงระยะเวลาของการผสมเช่นเดียวกับเกลือ สำหรับน้ำเติมร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก โดยเติมในช่วงที่เติมเกลือครึ่งหนึ่งและเติมในช่วงเติม STPP อีกครึ่งหนึ่ง เพื่อให้ส่วนผสมต่าง ๆ เข้ากันดีขึ้น แล้วเติม SPI และ Gluten ในช่วงระยะการผสมที่ระดับความเร็วปานกลาง เป็นระยะเวลา 2 นาที

จากนั้นทำการผสมส่วนผสมทั้งหมดที่ความเร็วระดับสูง เป็นระยะเวลา 2 นาที แล้วนำส่วนผสมทั้งหมดบรรจุในไส้ไฟบรัส อัดส่วนผสมของเนื้อให้แน่นและไล่อากาศออกโดยใช้เครื่องอัดแบบไฮโดรลิค ใช้เวลาในการอัด 20 นาที ที่ความดัน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ก็จะได้ผลิตภัณฑ์เศษเนื้อนกกระจอกเทศขึ้นรูป จากนั้นชั่งน้ำหนัก นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วนำเศษเนื้อนกกระจอกเทศขึ้นรูป ที่ได้มาให้ความร้อนจนอุณหภูมิของใจกลางผลิตภัณฑ์เศษเนื้อนกกระจอกเทศขึ้นรูปได้ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการหล่อเย็นทันทีจนอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส) ก็จะได้เศษเนื้อนกกระจอกเทศขึ้นรูปเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์และทดสอบต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3.2 วิธีการผลิตเศษเนื้อนกกระจอกเทศขึ้นรูป

ที่มา : ธวัชชัย (2537)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.2 ศึกษาสมบัติของเศษเนื้อนกกระจอกเทศ

นำเศษเนื้อนกกระจอกเทศดิบ และ กลูเตน, โปรตีนถั่วเหลืองสกัด (Soy protein isolated, SPI) และโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต (Sodium tripolyphosphate, STPP) วิเคราห์คุณภาพทางเคมีและกายภาพ ดังนี้

3.4.2.1 การวิเคราะห์ทางเคมี

1.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเศษเนื้อนกกระจอกเทศ ตามวิธี AOAC (2000)

- โปรตีน
- ไขมัน
- ความชื้น
- เถ้า
- คาร์โบไฮเดรต

1.2 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกลูเตน และโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (Soy protein isolated, SPI) ตามวิธี AOAC (2000)

- โปรตีน
- ไขมัน
- ความชื้น
- เถ้า
- คาร์โบไฮเดรต

3.4.2.2 การวิเคราะห์ทางกายภาพ

3.4.2.2.1 ค่า Gel strength โดยนำตัวอย่างเศษเนื้อนกกระจอกเทศขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร หนา 15 เซนติเมตร วางไว้ในอุณหภูมิห้องก่อนทำการทดลองประมาณ 1 ชั่วโมง นำไปทำการทดสอบ Gel strength ด้วยเครื่องมือวิเคราะห์เนื้อสัมผัส Texture Analyser TA-XT Plus กำหนดหัววัดขนาด 20 มิลลิเมตร, ความเร็ว (Speed) 2 มิลลิเมตรต่อวินาที, ใช้ผลิตภัณฑ์หนา (Product height) 15 mm, ระยะทางที่กด (Distance) 10 mm ประยุกต์ตาม Walter *et. al.* (1987)

3.4.2.2.2 ศึกษาสมบัติทางวิสโคอิลาสติกของเศษเนื้อนกกระจอกเทศ ทำการศึกษาการพักความเค้น (Stress relaxation) และความเค้นสมดุลย์ (Equilibrium stress) โดยนำเศษเนื้อนกกระจอกเทศขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร หนา 15 เซนติเมตร วางไว้ในอุณหภูมิห้องก่อนทำการทดลองประมาณ 1 ชั่วโมง นำไปทำการทดสอบการพักความเค้น (Stress relaxation) โดยศึกษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ความเค้นสมดุลย์ (Equilibrium stress) ด้วยเครื่องมือวิเคราะห์เนื้อสัมผัส Texture Analyser TA-XT Plus กำหนดหัววัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร, ความเร็ว (Speed) 0.1 มิลลิเมตรต่อวินาที, ใช้ผลิตภัณฑ์หนา (Product height) 15 มิลลิเมตร, ร้อยละความเครียด (% Strain) 3% และเวลา (Time) 1800 วินาที ได้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรง (Force) กับเวลา (Time) พร้อมหาแบบจำลองของการพักความเค้นที่เหมาะสม ประยุกต์ตาม Shellhammer, Rumsey and Krochta (1997)

3.4.2.3 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเสียสภาพ (Denature) ของเศษเนื้อนกกระจอกเทศขึ้นรูปโดยใช้เทคนิค Differential Scanning Calorimitry (DSC) วิเคราะห์อุณหภูมิการเปลี่ยนสภาพธรรมชาติของเศษเนื้อนกกระจอกเทศดิบ และเศษเนื้อนกกระจอกเทศขึ้นรูป ด้วย DSC ปริมาณตัวอย่าง 10 mg และใช้ Empty pan เป็น Reference ให้ความร้อนกับตัวอย่างจาก 20-120 $^{\circ}$C ในอัตรา 5 $^{\circ}$C/min

3 .4.2.4 การวางแผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) โดยผันแปร SPI และ Gluten ในช่วงร้อยละ 0-5 โดยน้ำหนัก และผันแปร STPP ในช่วงร้อยละ 0-0.2 โดยน้ำหนัก

3.4.3 ศึกษาปริมาณส่วนผสมของกลูเตน, โปรตีนถั่วเหลืองสกัด , โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อ คุณภาพของเศษเนื้อนกกระจอกเทศขึ้นรูป

3.4.3.1 การวิเคราะห์ทางกายภาพ

3.4.3.1.1 ศึกษาสมบัติทางวิสโคอิลาสติกของเศษเนื้อนกกระจอกเทศขึ้นรูป นำเศษเนื้อนกกระจอกเทศขึ้นรูปมาศึกษาการพักความเค้น (Stress relaxation) และความเค้นสมดุลย์ (Equilibrium stress) พร้อมทั้งหาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ประยุกต์ตาม Shellhammer, Rumsey และ Krochta (1997)

3.4.3.1.2 ศึกษาค่าความแข็งของเจล (Gel strength) นำเศษเนื้อนกกระจอกเทศขึ้นรูปมาหาค่า Gel strength ประยุกต์ตาม Walter *et. al.* (1987)

3.4.3.2 ศึกษาค่าผลผลิตสุก (% Cooking yield) โดยการชั่งน้ำหนักเศษเนื้อนกกระจอกเทศขึ้นรูปก่อนและหลังการให้ความร้อน จากนั้นคำนวณหาค่า Cooking yield จากสูตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{Cooking yield} = 100 - \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนให้ความร้อน} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังให้ความร้อน}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนให้ความร้อน}}$$

ประยุกต์ตาม ธวัชชัย (2537)

3.4.3.3 ศึกษาค่าการหดตัว (Shrinkage) ประยุกต์ตาม Chen and Trout . (1991) โดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของเศษเนื้อนกกระจอกเทศขึ้นรูปก่อนและหลังการให้ความร้อน จากนั้นคำนวณหาค่า Shrinkage จากสูตร

$$\text{Shrinkage} = 100 - \frac{(\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของตัวอย่างก่อนให้ความร้อน} - \text{เส้นผ่าศูนย์กลางของตัวอย่างหลังให้ความร้อน}) \times 100}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของตัวอย่างก่อนให้ความร้อน}}$$

3.4.3.4 ศึกษาค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ (Water Holding Capacity) ใช้เทคนิคการกด โดยชั่งเนื้อประมาณ 0.3 กรัม วางบนกระดาษกรอง Whatman No.1 ที่ถูกดูดความชื้นด้วย KCI (Potassium chloride) อิ่มตัว จากนั้นประกบด้วยประกบด้วยกระจก 2 แผ่น กดด้วยมวล 1 กิโลกรัม นาน 10 นาที จากนั้นหาน้ำหนักน้ำที่แพร่ออกมา ประยุกต์ตามวิธีของ Pietrasik (1999)

3.4.3.5 ศึกษาเจลอิเลคโตโฟลิซิส (SDS-PAGE) นำเศษเนื้อนกกระจอกเทศขึ้นรูปมาทำเจลอิเลคโตโฟลิซิส โดยใช้ Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel (SDS-PAGE) ประยุกต์ตามวิธีของ Apichartsrangkoon *et. al.* (1998) โดยนำเศษเนื้อนกกระจอกเทศ 0.5 g มาละลายในสารละลาย SDS เข้มข้น 10% (w/v) และ 2% Mercapto ethanol ต้มในน้ำเดือดนาน 3 นาที นำสารละลายโปรตีนไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที

วิเคราะห์ SDS-PSGE โดยใช้ Running gel ซึ่งมีความเข้มข้นของ Polyacrylamide 10% (w/v) และ Stacking gel ซึ่งมี Polyacrylamide 4% (w/v) ปริมาณโปรตีนของตัวอย่าง คือ 5 μg ย้อมสีโปรตีนโดยใช้ Coomassie blue R-250 เข้มข้น 0.025% ขจัดสี (Destain) ด้วยสารละลาย 40% Methanol และ 7% Acetic acid

3.4.3.6 วางแผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) โดยผันแปร SPI และ Gluten ในช่วงร้อยละ 0-5 โดยน้ำหนัก และผันแปร STPP ในช่วงร้อยละ 0-0.2 โดยน้ำหนัก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved