บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุดิบ

- น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ยี่ห้อกุ๊ก บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด
- โปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (Soy protein concentrate) (The Solae Company, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- แคปปา-คาราจีแนน (K-carrageenan) (MSC CO, Ltd., ประเทศเกาหลี)
- เกลือโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl)
- ฟอสเฟต (Mixed phosphate)
- น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)
- น้ำกลั่น (Distilled water)
- เนื้อไก่
- เครื่องเทศสำเร็จรูป (โบโลญ่า มิกซ์) (บริษัท แอบบรา จำกัด, ประเทศไทย)
- หนังไก่แช่แข็ง

3.1.2 สารเคมี

- เอนไซม์ปาเปน (Papain) (Merck, ประเทศเยอรมัน) (EC number: 3.4.22.2 และ activity: >30,000 USP units/mg)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) Analytical grade (Labscan Asia co, Ltd., ประเทศไทย)
- กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl)
- Bio-rad protein assay (Bio-rad, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 1 – aniline – 8 – naphthalene sulfonate (ANS) (Sigma-aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Phosphate buffer (pH 7) (Merck, ประเทศเยอรมัน) โซเดียมโดเดซิล ซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS) (Ajax Finechem, ประเทศออสเตรเลีย)
- กรดซัลฟูริกเข้มข้น (Conc. sulfuric acid, Conc. H_2SO_4) (QReC, นิวซีแลนด์)
- Catalyst mixture (Copper sulfate + Potassium sulfate) (Labscan Asia co, Ltd., ประเทศไทย)

- กรดบอริก (Boric acid, H_3BO_3) (Labscan Asia co, Ltd., ประเทศไทย)
- เมทิลเรด (Methylred, $C_{15}H_{15}N_3O_2$) และโบรโมคลีซอลกรีน (Bromocresol green, $C_{21}H_{14}Br_4O_5S$) (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- เอทานอล (Ethanol) (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) Commercial grade
- ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether) (QReC, นิวซีแลนด์)
- บอแร็ก (di-sodium tetraborate decahydrate) (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- O-phthaldialdehyde (OPA) (Sigma-aldrich, ประเทศเยอรมัน)
- di-thiothreitol (DTT) (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- L-Serine (Sigma-aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.2 เครื่องมือวิเคราะห์และอุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

- อุปกรณ์เตรียมตัวอย่าง เช่น เครื่องแก้ว เครื่องชั่ง หลอดเซนตริฟิวส์
- กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman paper No. 1)
- กระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman paper No. 4)
- ลูกตุ้มน้ำหนัก 5 กิโลกรัม
- โถดูดความชื้น
- ถ้วยอะลูมิเนียม (Aluminium can)
- ครูซิเบิล (Crucible)
- นาฬิกาจับเวลา
- เทอร์โมมิเตอร์

3.2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

- Homogenizer ยี่ห้อ Nissei รุ่น AM-8
- Obital lab-line shaker ยี่ห้อ Accuplus รุ่น i250
- Hotplate stirrer ยี่ห้อ Fisher scientific รุ่น 002278
- ตู้อบลมร้อน (Hot air dryer) บริษัท กล้วยน้ำไทเตาอบ
- เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (Model TE 313S-DS 310, Sartorius, USA)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) (Model HARRIER 15/80 Bench Top Refrigerated Centrifuge, Sanyo, Japan)

- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (Model WB-22, Memert, German)
- ตู้อบไฟฟ้า ยี่ห้อ Heraeus รุ่น D-6450 Hanau
- Texture Analyzer ยี่ห้อ Stable Micro System รุ่น TA-XT2I
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5800LV
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Model SevenEasy, Mettler Toledo, Switzerland)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ยี่ห้อ Jenway รุ่น 6405 UV/Vis
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrofluorometer) ยี่ห้อ Jasco รุ่น FP-6200, Japan
- Hunterlab chromometer ยี่ห้อ Color Quest XE รุ่น CQX 3461
- ชุดอุปกรณ์ย่อยโปรตีน ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น TR
- ชุดกลั่นโปรตีน ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น VAP1
- Soxhlet distillator ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น 306 M
- เครื่องบดเนื้อ ยี่ห้อ Linkrich รุ่น GTJ12 Meat mincer
- เครื่องสับผสม (Silent cutter) ยี่ห้อ Cuttex รุ่น M 11 N
- เครื่องบรรจุไส้ไส้กรอก ยี่ห้อ TALSA รุ่น H15P1
- เครื่องปิดผนึก ยี่ห้อ HAND WRAPPER รุ่น GW-460
- Food processor ยี่ห้อ National รุ่น MK-5080M
- ตู้อบแบบลมร้อน (Hot air oven) (Model UNB 500, Memert, German)

3.3 วิธีการทดลอง

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนถั่วเหลืองที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสท โดยวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Kjeldahl Method (AOAC, 2000) และ วิเคราะห์ปริมาณความชื้น ด้วยวิธี Hot Air Oven Method (AOAC, 2000) รายละเอียดของวิธีวิเคราะห์อยู่ในภาคผนวก ข

3.3.1 การเตรียมโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสทด้วยเอนไซม์ปาเปน

ศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 0.2, 0.4 และ 0.6 โดยน้ำหนักของปริมาณโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (Soy protein concentrate) ระยะเวลาในการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองที่ 30, 40 และ 50 นาที เปรียบเทียบกับโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (Control) โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลใน CRD (Complete Randomize Design) และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

วิธีการเตรียมโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสท (ดัดแปลงจาก Wu *et al.*, 1998)

โดยนำ Soy protein concentrate 10 กรัม เติมน้ำให้ได้โปรตีนความเข้มข้นร้อยละ 10 ปรับพีเอช เท่ากับ 7 แล้วนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนร้อยละ 0.2, 0.4 และ 0.6 โดยน้ำหนักของปริมาณโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสพร้อมทั้งเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm เป็นเวลา 30, 40 และ 50 นาที ด้วยเครื่องเขย่า (Obital Lab-Line Shaker) หยุดการทำงานของเอนไซม์ โดยปรับพีเอชเท่ากับ 7 และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์

วิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพของโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสท ดังนี้

- การละลายของโปรตีนที่พีเอชต่างๆในช่วงพีเอช 3-11 (ดัดแปลงจาก Wu *et al.*, 1998)
- ส่วนที่ไม่ละลายน้ำที่ผิวหน้าของโปรตีน (Surface hydrophobicity) ด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูโอโรมิเตอร์ (Spectrofluorometer) โดยใช้ 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS) เป็น Hydrophobic probe (Hayakawa and Nakai, 1985)
- สมบัติการเป็นอิมัลซิฟายอิ้ง (Emulsifying properties) โดยวิเคราะห์ค่าดัชนีความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (Emulsifying Activity Index, EAI) และดัชนีความคงตัวของอิมัลชัน (Emulsion Stability Index, ESI) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (Pearce and Kinsella, 1979)

รายละเอียดของวิธีวิเคราะห์อยู่ในภาคผนวก ก วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดการทดลอง โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เลือกชุดการทดลองที่เหมาะสมที่สุด เพื่อใช้ในการเตรียมน้ำมันพรีอิมัลซิฟายด์ โดยพิจารณาจากสมบัติการเป็นอิมัลซิฟายอิ้งเป็นหลัก คือ เลือกชุดการทดลองที่มีค่าดัชนีความสามารถในการเกิดอิมัลชันสูงที่สุด และพิจารณาค่าดัชนีความคงตัวของอิมัลชัน การละลายและส่วนที่ไม่ละลายน้ำที่ผิวหน้าของโปรตีนเพื่อใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนความสามารถในการเป็นอิมัลซิฟายอิ้ง จากนั้นวิเคราะห์ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis) (Nielsen *et al.*, 2001) ของชุดการทดลองดังกล่าว รายละเอียดของวิธีวิเคราะห์อยู่ในภาคผนวก ก

3.3.2 การเตรียมน้ำมันพรีอิมัลซิฟายด์โดยใช้โปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสทที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 3.3.1

ศึกษาผลของปริมาณน้ำมันร้อยละ 50-58 โดยน้ำหนัก ปริมาณโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสทร้อยละ 3-5 โดยน้ำหนัก และปริมาณคาราจีแนนร้อยละ 0-2 โดยน้ำหนักของส่วนผสมน้ำมันพรีอิมัลซิฟายด์ โดยวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)

วิธีการเตรียมน้ำมันพรีอิมัลซิฟายด์ (ดัดแปลงจาก Kayaardi and Gok, 2003)

โดยนำสารละลายโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสทปั่นเป็นเวลา 2 นาที ที่ความเร็วรอบ 9000 rpm ด้วยเครื่อง Homogenizer จากนั้นเติมน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ปั่นต่ออีก 3 นาที ที่ความเร็วรอบ 9000 rpm จากนั้นเติมคาราจีแนน ปั่นต่ออีก 1 นาที สัดส่วนของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน โปรตีน และคาราจีแนน ตามที่ระบุในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงรหัสและสัดส่วนของค่าจริงของปัจจัยที่ใช้ในการเตรียมน้ำมันพรีอิมัลซิฟายด์

Design factors	-1.682	-1	0	1	1.682
X1:protein (%)	3	3.4	4	4.6	5
X2:oil (%)	50	51.6	54	56.4	58
X3:carrageenan (% of total)	0	0.4	1	1.6	2

วิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพของน้ำมันพรีอิมัลซิฟายด์ ดังนี้

- ความสามารถในการทำให้เกิดอิมัลชัน (Emulsion capacity) ด้วยวิธีการเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge) (Hughes and Cofrades,1996)
- ความคงตัวของอิมัลชัน (Emulsion stability) ด้วยวิธีการเซนตริฟิวจ์ (Aktas and Gencelep, 2006) โดยเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน
- ลักษณะเนื้อสัมผัส โดยวัดค่าความแข็ง (Hardness) ด้วยเครื่อง Texture Analyzer (Braipson-Danthine and Deroanne, 2004) โดยใช้หัววัดรูปโคน No. P/45C

- การกระจายตัวของไขมันในน้ำมันพรีอิมัลซิฟายด์ที่มีการปรับปรุงคุณภาพด้วย คาราจีแนนเปรียบเทียบกับน้ำมันพรีอิมัลซิฟายด์ที่ไม่มีการเติมคาราจีแนน ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) (Tsumura *et al.*, 2005)

รายละเอียดของวิธีวิเคราะห์อยู่ในภาคผนวก ก วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดการทดลอง โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เลือกชุดการทดลองที่เหมาะสมที่สุด โดยพิจารณาจากค่าความสามารถในการทำให้เกิดอิมัลชัน ความคงตัวของอิมัลชัน และ ลักษณะเนื้อสัมผัส โดยเลือกชุดการทดลองที่มีค่าสูงที่สุด เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

3.3.3 การใช้น้ำมันพรีอิมัลซิฟายด์จากข้อ 3.3.2 ในการผลิตไส้กรอกอิมัลชัน

ผลิตไส้กรอกอิมัลชันเนื้อไก่โดยใช้น้ำมันพรีอิมัลซิฟายด์เปรียบเทียบกับไขมันชนิดอื่นๆ คือหนังไก่ และน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันที่ไม่ผ่านการสับผสม โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomize Design: CRD)

วิธีการเตรียมไส้กรอกไก่ (ดัดแปลงจาก Sallam *et al.*, 2004)

การเตรียมเนื้อไก่

นำเนื้อไก่มาล้างให้สะอาด ทิ้งให้สะเด็ดน้ำและหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นบดด้วยเครื่องบดเนื้อให้ละเอียด

ส่วนผสม (ร้อยละของส่วนผสมทั้งหมด)

เนื้อไก่	38.6 %
น้ำแข็ง	30.0 %
ไขมัน	26.5 %
เครื่องเทศ	3.5 %
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1.2 %
ฟอสเฟต	0.2 %

วิธีการผลิตไส้กรอก

บดเนื้อที่เตรียมไว้ คลุกด้วยเกลือบริโภคให้เข้ากัน นำมาเก็บที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเนื้อบดที่เตรียมไว้มาสับผสมในเครื่องสับผสม เติมน้ำแข็งและฟอสเฟต สับนวดเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมไขมันและน้ำแข็งลงไปสับผสมรวมกัน สับนวด

เป็นเวลา 2 นาที เติมส่วนผสมที่เหลือ สับนวดจนเกิดอิมัลชัน ควบคุมอุณหภูมิไม่ให้เกิน 15 องศาเซลเซียส นำส่วนที่สับผสมแล้วมาบรรจุไส้พลาสติก เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.1 เซนติเมตร ระวังไม่ให้มีฟองอากาศระหว่างการบรรจุ นำมาผูกเป็นท่อนยาว 15 เซนติเมตร น้ำหนัก 85 กรัม เท่าๆกัน จากนั้นนำเข้าอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาต้มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว โดยแช่ในน้ำเย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำไส้กรอกที่ได้บรรจุลงในภาชนะที่เตรียมไว้ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจวิเคราะห์คุณภาพต่อไป

วิเคราะห์สมบัติของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอิมัลชัน

การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ ดังนี้

- ความคงตัวของอิมัลชัน (Emulsion stability) (Lin and Huang, 2003)
- ความสามารถในการอุ้มน้ำ (Water holding capacity) (Rawdkuen and Benjakul, 2008)
- การสูญเสียน้ำหนักภายหลังการให้ความร้อน (Cooking loss) (Crehan and Hughes, 2000)
- วัดสี ด้วยเครื่องวัดสี (Hunterlab chromometer) (Kayaard and Gok, 2003)
- ลักษณะเนื้อสัมผัส ด้วยเครื่อง Texture analyzer ประเมินในรูปแบบ Texture Profile Analysis (Pierasik and Duda, 2000)
- การกระจายตัวของไขมันดัดแปลงในไส้กรอกอิมัลชันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning Electron Microscope, SEM) (Tsumura *et al.*, 2005)

การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี ดังนี้

- ปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Kjeldahl Method (AOAC, 2000)
- ปริมาณไขมัน ด้วย Soxhlet (AOAC, 2000)
- ปริมาณความชื้น ด้วย Air Oven Method (AOAC, 2000)

รายละเอียดของวิธีวิเคราะห์อยู่ในภาคผนวก ก และ ข วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดการทดลอง โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส

เพื่อศึกษาความแตกต่างของตัวอย่างด้านลักษณะปรากฏ กลิ่นถั่วเหลือง ความแข็ง ความยืดหยุ่น และความชุ่มน้ำของไส้กรอกอิมัลชัน โดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 20 คน ประเมิน

คุณภาพทางประสาทสัมผัส ด้วยวิธีการให้คะแนนความแตกต่าง (Scoring test) และศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์ด้านลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส กลิ่นรส และความชอบโดยรวมของไส้กรอกอิมัลชัน โดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 40 คน ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบแบบ 7-Point hedonic scale วางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design, RCBD) และวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้เพื่อหาความแปรปรวน (Analysis of Variance) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างสิ่งที่ทดลองโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ตัวอย่างแบบประเมินแสดงในภาคผนวก ค