บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 ผลิตภัณฑ์ไส้กรอก

ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้ไส้กรอกไก่อิมัลชั่นรมควันจากแหล่งการผลิตไส้กรอกทางการค้าของบริษัทแห่งหนึ่งในเขตปริมณฑลที่ได้รับการรับรองมาตรฐาน GMP โดยมีขั้นตอนการผลิตดังภาพที่ 3.1

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากกระบวนการผลิตไส้กรอกไก่อิมัลชั่นรมควัน ภายหลังการทำให้สุก

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 Lactic acid (L - LAC FG 80) ของบริษัท วิคกี้ เอนเตอร์ไพรซ์ จำกัด

3.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.3.1 เครื่องชั่งสารอิเล็คทรอนิคส์(เตรียมอาหาร)	CHOYO Mk-500c (JAPAN)
3.3.2 Hot plate stirrer	SNIJDERS (HOLLAND)
3.3.3 เครื่องชั่งตัวอย่าง	AND EK-300I (JAPAN)
3.3.4 Hot air oven	MEMMERT (GERMANY)
3.3.5 Autoclave	HIRAYAMA HA-3D (JAPAN)
3.3.6 Water bath อุณหภูมิ 100 $\pm$ 1 $^{\circ}$C	MEMMERT (GERMANY)
3.3.7 Water bath อุณหภูมิ 41.5 $\pm$ 1 $^{\circ}$C	MEMMERT (GERMANY)
3.3.8 Water bath อุณหภูมิ 45 $\pm$ 1 $^{\circ}$C	HAAKE SWB 20 (GERMANY)
3.3.9 Incubator อุณหภูมิ 37 $\pm$ 1 $^{\circ}$C	MEMMERT (GERMANY)
3.3.10 Stomacher	VOLEX (U.S.A.)

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

3.4.1 Plate count agar (PCA)	MERCK (U.S.A.)
3.4.2 Buffer peptone water (BPW)	DIFCO (U.S.A.)
3.4.3 Rappaport-vasilliadis medium (RVS)	MERCK (U.S.A.)
3.4.4 Xylose-lysine-deoxycholate (XLD) agar	MERCK (U.S.A.)
3.4.5 Brilliant green agar (BGA)	OXOID (ENGLAND)
3.4.6 Baird parker medium (BP)	MERCK (U.S.A.)
3.4.7 Violet red bile agar (VRBA)	MERCK (U.S.A.)
3.4.8 Tryptic soy broth (TSB)	MERCK (U.S.A.)
3.4.9 Peptone	DIFCO (U.S.A.)
3.4.10 Sodium chloride	MERCK (U.S.A.)

3.5 สถานที่ดำเนินการทดลอง

3.5.1 โรงงานผลิตไส้กรอกไก่อิมัลชั่นรมควันในเขตปริมณฑล

3.5.2 ห้องปฏิบัติการบริษัท ศรีไทยฟู้ดแอนด์เบฟเวอร์เรจ จำกัด (มหาชน) 69 หมู่ 4 ถ. วัดกิ่งแก้ว ต. ราชาเทวะ อ.บางพลี จ.สมุทรปราการ 10540

3.6 ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย

3.6.1 ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ในขั้นตอนก่อนการทำให้สุก หลังจากการทำให้สุก และในผลิตภัณฑ์ที่บรรจุในถุงปิดสนิท

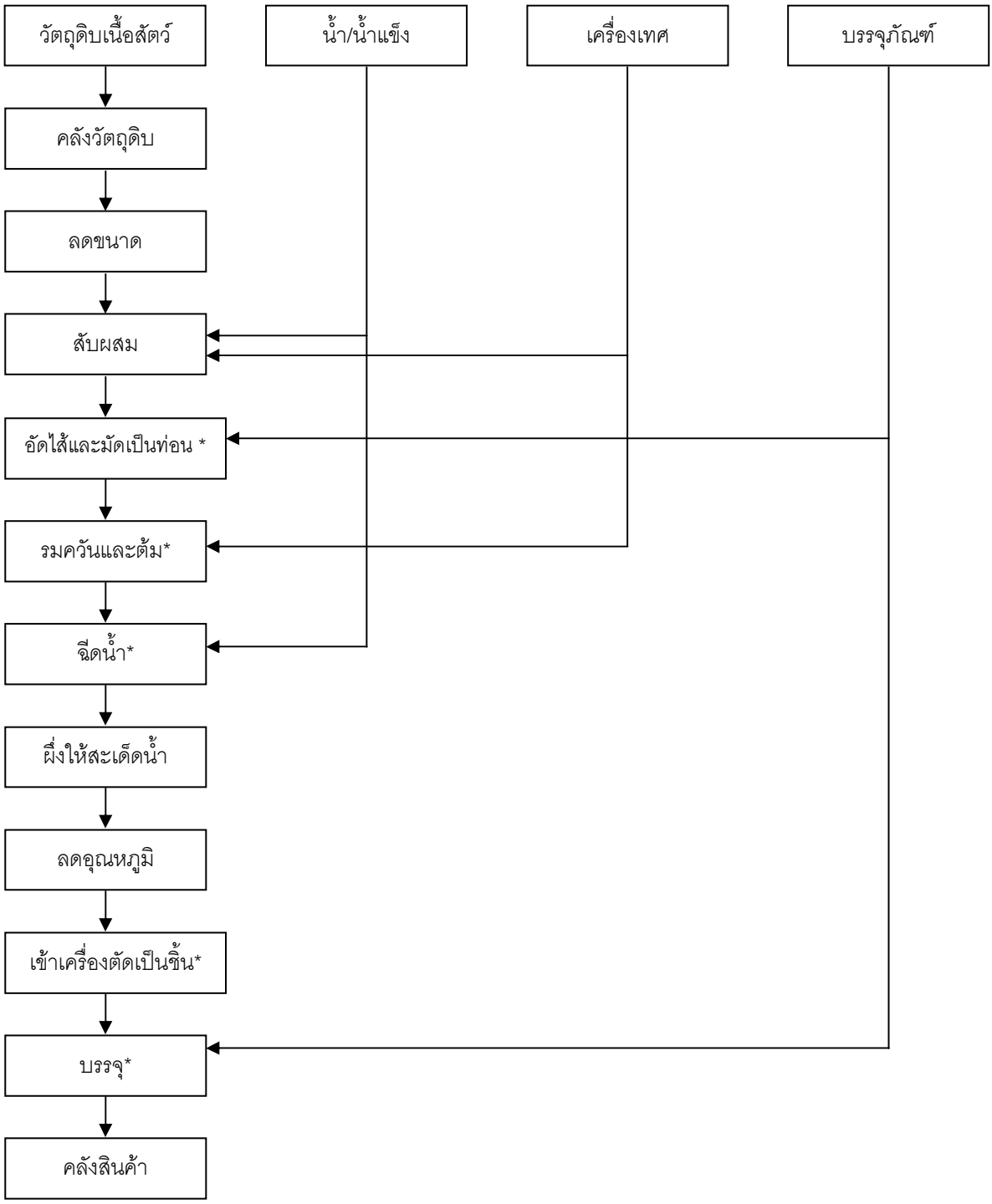
ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างไส้กรอกไก่อิมัลชั่นรมควันตามจุดต่างๆ (ตามภาพที่ 3.1) ดังนี้

- ไส้กรอกที่อัดไส้แล้วก่อนเข้าตู้อบ
- ไส้กรอกหลังออกจากตู้อบ (ก่อนฉีดน้ำ)
- ไส้กรอกหลังออกจากตู้อบ (หลังฉีดน้ำ)
- ไส้กรอกหลังออกจากเครื่องตัดไส้กรอก
- ไส้กรอกที่บรรจุใส่ถุงปิดสนิท

การเก็บตัวอย่างในจุดทั้ง 5 จุด นั้นต้องทำการเก็บตัวอย่างในชุดการผลิตเดียวกัน (การผลิต 1ชุด เท่ากับประมาณ 1.5 ตันหรือ 1,500 กิโลกรัม) โดยปริมาณการเก็บตัวอย่างจะสุ่มเก็บจุดละ 1 กิโลกรัม แต่ในผลิตภัณฑ์ที่บรรจุแล้วจะทำการสุ่มตัวอย่าง 3 กิโลกรัม (สินค้าบรรจุถุงละ 1 กิโลกรัม)

การเก็บตัวอย่างทำการเก็บทั้งหมด 4 ชุดการผลิตในช่วงเวลา 3 เดือน

จากตัวอย่างที่สุ่มเก็บมานำมาทำการตรวจหาจุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีบ่งชี้ความปลอดภัยในอาหาร ได้แก่ *Salmonella* spp., *Staph. aureus* และตรวจนับจุลินทรีย์ในกลุ่มที่เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงคุณภาพ ได้แก่ Total Plate Count และ Coliforms ตามลำดับ



* จุดที่ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตไส้กรอกไก่อิมัลชั่นรมควัน

ภาพที่ 3.1 กระบวนการผลิตไส้กรอกไก่อิมัลชั่นรมควัน

3.6.1.1 การตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Bacteria Plate Count) (ISO 4866 : 2003)

3.6.1.1.1 การเตรียมตัวอย่างวัตถุดิบ สุ่มเก็บตัวอย่างไส้กรอกไก่อิมัลชั่นรมควันในกระบวนการผลิตตามภาพที่ 3.1

3.6.1.1.2 นำตัวอย่างที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างในข้อ 3.6.1.1.1 ปริมาณ 25 กรัม เติมสารละลาย DF (Peptone salt dilution fluid) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่อง Stomacher เพื่อผสมตัวอย่าง ได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 10^{-1} แล้วนำไปทำการเจือจางแบบ 10 fold dilution ต่อไปจนได้ระดับความเจือจางที่ต้องการ

3.6.1.1.3 นำตัวอย่างที่เจือจางในระดับความเข้มข้นต่างๆ ในข้อ 3.6.1.1.2 ใส่ลงใน Petri – dish ทุก Dilution โดยใส่ Dilution ละ 1 มิลลิลิตร (ทำ dilution ละ 2 ซ้ำ)

3.6.1.1.4 Pour plate ด้วย PCA (Plate count agar) ที่หลอมละลายแล้วและมีอุณหภูมิ 44 – 47 °C ให้หนา 10 – 15 มิลลิลิตร ต่อ Plate ผสมให้เข้ากับ Suspension ของตัวอย่าง

3.6.1.1.5 เมื่อ PCA แข็งตัวนำเข้าบ่มในตู้ Incubator ที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 °C เป็นเวลา 72 $\pm$ 3 ชั่วโมง

3.6.1.1.6 การรายงานผล เลือก Plate ที่มี Colonies ระหว่าง 15 – 300 Colonies เพื่อคำนวณเป็นโคโลนีต่อกรัม

3.6.1.2 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp. (ISO 6579 : 2002)

3.6.1.2.1 การเตรียมตัวอย่างวัตถุดิบ สุ่มเก็บตัวอย่างไส้กรอกไก่อิมัลชั่นรมควันในกระบวนการผลิต ตามภาพที่ 3.1

3.6.1.2.2 Pre – enrichment โดยนำตัวอย่างที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างในข้อ 3.6.1.2.1 ปริมาณ 25 กรัม เติม BPW (Buffered peptone water) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่อง Stomacher เพื่อผสมตัวอย่าง แล้วนำเข้าบ่มใน Incubator ที่อุณหภูมิ 37 $\pm$ 1°C เป็นเวลา 18 $\pm$ 2 ชั่วโมง

3.6.1.2.3 Enrichment โดยดูดสารละลายจากการข้อ 3.6.1.2.2 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ใน RVS broth (Rappaport – vasilliadis medium with soya) 10 มิลลิลิตร นำเข้าบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 41.5 $\pm$ 1°C เป็นเวลา 24 $\pm$ 3 ชั่วโมง

3.6.1.2.4 Selective ใช้ loop แตะเชื้อจาก RVS 1 loop แล้ว Streak ลงบน BGM (Brilliant green agar modified) , XLD (Xylose lysine deoxycholate agar) นำไปบ่มใน Incubator ที่อุณหภูมิ 37 $\pm$ 1°C เป็นเวลา 24 $\pm$ 3 ชั่วโมง

3.6.1.2.5 การอ่านผล Positive

BGM – Colony สีชมพูใส หรือสีขาวขุ่น

XLD – Colony สีดำล้อมรอบด้วยสีแดง หรือสีชมพู

1. จาก Plate BGM และ XLD ที่เป็น negative ให้นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 ± 1°C เป็นเวลา 24 ± 3 ชั่วโมง ถ้าผลยังเป็น negative ให้รายงานผลเป็น ตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่าง

2. ถ้ามี Colony ของเชื้อขึ้นบน Plate ให้เลือกมา 1 Colony ที่แน่ใจว่าเป็น Colony ของเชื้อ แต่ถ้าใน 1 plate มี typical colony > 5 Colonies ให้นำมาทั้งหมด 5 Colonies จากนั้น Streak ลงบน Nutrient agar Plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 1°C เป็นเวลา 24 ± 3 ชั่วโมง จากนั้นนำ pure culture ที่ได้ ทำ Biochemical Test และ Serological Test แล้วนำเชื้อจาก 1 colony stab ลง Butt และ Streak ลงบน Slant ของ TSI และ LIA agar นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 ± 1°C เป็นเวลา 24 ± 3 ชั่วโมง ถ้าผลเป็น Negative ให้เลือกอีก 4 colony ลง TSI, LIA agar และ Nutrient agar Plate อีกครั้งหนึ่งนำเข้าบ่มที่ อุณหภูมิ 37 ± 1°C เป็นเวลา 24 ± 3 ชั่วโมง จากนั้นนำ Colony ที่ Positive ใน Plate Nutrient agar ไปทำ Biochemical Test และ Serological Test ตามภาคผนวก ก 1 และ ก 2 ตามลำดับ

3.6.1.3 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Staph. aureus* (ISO 6888 : 1999)1

3.6.1.3.1 การเตรียมตัวอย่างวัตถุดิบ สุ่มเก็บตัวอย่างไส้กรอกไก่อิมัลชั่นรมควันในกระบวนการผลิต ตามภาพที่ 3.1

3.6.1.3.2 นำตัวอย่างที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างในข้อ 3.6.1.3.1 ปริมาณ 25 กรัม เติมสารละลาย DF (Peptone Salt Dilution Fluid) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่อง Stomacher เพื่อผสมตัวอย่าง จะได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 10^{-1}

3.6.1.3.3 ใช้ pipette ดูดสารละลายจากข้อ 3.6.1.3.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน TSB (Tryptic Soy Broth) 10 มิลลิลิตร นำเข้าบ่มใน Incubator ที่อุณหภูมิ 37 ± 1°C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

3.6.1.3.4 ใช้ pipette ดูดสารละลายจากข้อ 3.6.1.3.3 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบน plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ BP (Baird Parker medium) + 30 % Egg yolk แล้วทำการ spread ให้กระจายทั่ว plate นำเข้าบ่มใน Incubator ที่อุณหภูมิ 37 ± 1°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.6.1.3.5 การอ่านผล Positive

Colonies สีดำ ล้อมรอบด้วยโซนสีขาวขุ่น (Apaque zone)

Colonies สีดำล้อมรอบด้วยโซนใส (Clear zone)

Colonies ดำวาว นูน ที่ไม่มีโซน

เมื่อพบ Colonies ที่ให้ผล Positive ให้ขั้นตอนการ Confirmation *Staph. aureus* ตามผนวก ก. 3

3.6.1.4 การตรวจวิเคราะห์ Coliforms (ดัดแปลงจาก BAM : Enumeration of *E. coli* and the Coliform Bacteria, chapter 4)

3.6.1.4.1 การเตรียมตัวอย่าง นำเชื้อที่ขึ้นในการตรวจวิเคราะห์ Total Bacteria Plate Count ใน Dilution ที่อ่านค่าได้ทั้งหมดมาทำการถ่ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ VRBA (Violet red bile agar) ทุก Colonies นำเข้าบ่มใน Incubator ที่อุณหภูมิ 37 $\pm$ 1°C เป็นเวลา 24 $\pm$ 3 ชั่วโมง

3.6.1.4.2 การอ่านผล เลือกนับ Colony ที่มีสีชมพู สีชมพูบานเย็น แล้วนำไปคำนวณเป็น โคโลนีต่อกรัม เก็บเพาะเลี้ยงเชื้อที่มี Colonies สีชมพูทั้งหมดลงใน TSA deeptube agar

3.6.1.4.3 ทำการสุ่มหลอด TSA deeptube agar โคโลนีที่ให้ผลเป็นบวกในข้อ 3.6.1.4.2 เพื่อทำการยืนยันสายพันธุ์ของ Coliforms ที่พบในตัวอย่างไส้กรอกไก่อิมัลชั่นรมควัน ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

3.6.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นกรดแลคติคต่อการลดจำนวนสารละลายเชื้อ *A. caviae* ที่แยกได้จากกระบวนการผลิตไส้กรอกไก่อิมัลชั่นรมควันในหลอดทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design (4 X 3) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายกรดแลคติค ต่อปริมาณความเข้มข้นของเชื้อในระดับต่างๆ ในช่วงระยะเวลา 0 1 5 10 และ 15 นาทีตามลำดับ

<u>ปัจจัยที่ 1</u> ระดับความเข้มข้นของสารละลายกรดแลคติคที่เหมาะสม

กลุ่มที่ 1 เติมน้ำ(อุณหภูมิห้อง) 0%

กลุ่มที่ 2 เติมสารละลายกรดแลคติคความเข้มข้น 1.5 %

กลุ่มที่ 3 เติมสารละลายกรดแลคติคความเข้มข้น 2.0%

กลุ่มที่ 4 เติมสารละลายกรดแลคติคความเข้มข้น 2.5%

ปัจจัยที่ 2 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการศึกษา คือ สารละลายเชื้อที่ความเข้มข้น 10^2 10^4 และ 10^6 cfu/ml ตามลำดับ (เป็น Coliforms สายพันธุ์ที่พบมากที่สุดในกระบวนการผลิตมาทำการทดลองในหลอดทดลอง)

การเตรียมสารละลายกรดแลคติคที่ความเข้มข้น 1.5 2.0 และ 2.5%

- กรดแลคติคที่ใช้คือ L-LAC FG 80 ของ บริษัท วิคกี้ เอนเตอร์ไพรซ์ จำกัด

- ผสมกรดแลคติคกับน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตามระดับความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากนั้นดูดสารละลายกรดแลคติคที่เตรียมได้ใส่หลอดทดลองความเข้มข้นละ 9 ml. ต่อหลอด

- ดูดสารละลายเชื้อ *A. caviae* ที่ระดับ 10^3 10^5 และ 10^7 cfu/ml ปริมาณ 1 ml ใส่ลงในหลอดที่มีสารละลายกรดแลคติคที่เตรียมจากข้างต้น ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 0 1 5 10 และ 15 นาที ทำการตรวจนับเชื้อตามเวลาที่กำหนดไว้ โดยดูดสารละลายเชื้อในกรดแลคติค ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาณ 1 ml. ลงบนอาหาร VRBA ทำการ Spread plate นำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 37 $\pm$ 1°C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

3.6.3 การศึกษาผลของกรดแลคติคต่อการลดจำนวนของเชื้อ *A. caviae* ที่แยกได้จากกระบวนการผลิตในไส้กรอกไก่อิมัลชั่นรมควันด้วยวิธีการราด

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยศึกษาผลของสารละลายกรดแลคติคต่อการลดจำนวนเชื้อ A. caviae ในช่วงระยะเวลาการเก็บไส้กรอกไก่อิมัลชั่นรมควันที่อุณหภูมิ 4 $\pm$ 1°C

กรดแลคติคที่ใช้ในการราดไส้กรอกไก่อิมัลชั่นรมควัน แบ่งเป็น 4 กลุ่มการทดลอง ได้แก่

กลุ่มที่ 1	กลุ่มควบคุมที่ราดด้วยน้ำ (อุณหภูมิห้อง) 0%
กลุ่มที่ 2	ราดสารละลายกรดแลคติคความเข้มข้น 1.5%
กลุ่มที่ 3	ราดสารละลายกรดแลคติคความเข้มข้น 2.0%
กลุ่มที่ 4	ราดสารละลายกรดแลคติคความเข้มข้น 2.5%

1) ไส้กรอกทั้ง 4 กลุ่มน้ำหนัก 70 กรัมต่อชิ้น นำมาผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแสง UV เป็นเวลา 60 นาที กลับชิ้นไส้กรอกทุก 30 นาที

2) ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกไก่อิมัลชั่นรมควันในแต่ละกลุ่มที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแสง UV แล้ว ทำการถ่ายสารละลายเชื้อ Coliforms ที่คัดแยกได้จากกระบวนการผลิตความเข้มข้น 10^2 cfu / ml โดยการนำไส้กรอกมาทำการจุ่มในสารละลายเชื้อ Coliforms เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำขึ้นผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 15 นาที

3) นำผลิตภัณฑ์ไส้กรอกในแต่ละกลุ่มราดด้วยสารละลายกรดแลคติค ที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งการราดด้วยกรดแลคติคจะใช้ถังฝักบัวราดลงบนผลิตภัณฑ์ไส้กรอกที่ทำการเกลี่ยให้สม่ำเสมอบนโต๊ะบรรจุสินค้า โดยใช้กรดแลคติค 2 ลิตรต่อไส้กรอก 1 กิโลกรัม จากนั้นผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 30 นาที

4) ทำการบรรจุสินค้าในถุงปิดสนิท นำเข้าเก็บในห้องเย็นอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 21 วัน

3.6.3.1 ตรวจสอบผลทางจุลชีววิทยา ด้วยการตรวจนับตรวจนับ Coliforms ตามข้อ 3.6.1.4 (Spot technique) ในช่วงเวลา 21 วัน ทำการตรวจนับในวันที่ 0 1 3 5 7 14 และ 21 ตามลำดับ รายงานผลเป็น log cfu / g.

3.6.3.2 ตรวจวัดสีของผลิตภัณฑ์ โดยใช้เครื่อง Chromameter โดยวัดซ้ำ 3 ครั้ง

- ใช้ไส้กรอก 3 ชิ้นต่อหนึ่งตัวอย่าง (วัดที่ผิวนอก)
- ใช้หัววัดสีกับผิวไส้กรอกโดยตรง
- เครื่องรายงานผลเป็นค่าของสีโดยอัตโนมัติ

3.6.3.3 ประเมินผลทางกายภาพ

3.6.3.3.1 การประเมินประสาทสัมผัส โดยใช้ Scoring test เพื่อประเมินประสาทสัมผัสทางด้านสี ลักษณะปรากฏ กลิ่นรส เนื้อสัมผัส และการยอมรับรวมของผู้บริโภค (ตามแบบฟอร์มการประเมินผลในภาคผนวก ข.) ต่อไส้กรอกไก่อิมัลชั่นรมควันที่ราดด้วยสารละลายกรดแลคติคที่ระดับความเข้มข้น 1.5 2.0 และ 2.5 % จากจำนวนผู้ทดสอบ 20 คน เทียบกับไส้กรอกไก่อิมัลชั่นรมควันที่เป็นกลุ่มควบคุมที่ราดด้วยน้ำโดยไม่เติมกรดแลคติค โดยกำหนดระดับคะแนนการประเมินทางด้านสี ลักษณะปรากฏ กลิ่นรส และเนื้อสัมผัสมีระดับคะแนน 5 ระดับ ส่วนการยอมรับโดยรวมมีระดับคะแนน 7 ระดับ ดังนี้

1 = ไม่ชอบมาก 2 = ไม่ชอบปานกลาง 3 = ไม่ชอบเล็กน้อย 4 = เฉยๆ
5 = ชอบเล็กน้อย 6 = ชอบปานกลาง 7 = ชอบมาก

การเตรียมตัวอย่างไส้กรอกเพื่อการทดสอบทำโดยกลุ่มตัวอย่างแต่ละกลุ่มมีทั้ง 2 แบบคือ

1) แบบดิบ เพื่อให้ผู้บริโภคประเมินทางด้านสี ลักษณะปรากฏ และกลิ่น-รส ของไส้กรอก

2) แบบสุก ด้วยการทำให้สุกด้วยเครื่อง Roller Grill เพื่อให้ผู้บริโภคประเมินทางด้านกลิ่นรสเนื้อสัมผัส และนำตัวอย่างทั้ง 2 แบบมาประเมินการยอมรับรวมของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

3.6.3.4 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองทุกการทดลอง มาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป (SPSS analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแต่ละวิธีด้วยวิธี Ducan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์