บทที่ 3

การทดลอง

แบ่งการทดลองทั้งหมดเป็น 4 ขั้นตอนได้แก่

3.1 การวางแผนการทดลอง

3.2 การเลือกสารเซอร์แฟคแตนท์ที่เหมาะสม

3.3 การเตรียมอาหารปลาแบบเม็ดแห้ง

3.4 การตรวจสอบคุณภาพของอาหารปลาในระหว่างการเก็บ

3.1 การวางแผนการทดลอง

เพื่อเลือกชนิดของสารเซอร์แฟคแตนท์ในปริมาณที่เหมาะสมที่จะใช้ในอาหารปลา โดยใช้อาหารปลาแบบเม็ดเปียกสำหรับทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ แล้วพิจารณาตามขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของอาหารปลา ซึ่งมี 2 ขนาดคือ 3 และ 5 มิลลิเมตร ทำการทดสอบทั้งในสภาวะน้ำนิ่งและน้ำไหล สารเซอร์แฟคแตนท์ที่จะใช้ในงานวิจัยนี้มี 3 กลุ่มคือ กลุ่มโมโนกลีเซอร์ไรด์ ได้แก่ โมโนกลีเซอร์ไรด์ กลุ่มทวีน ได้แก่ ทวีน 60 และ 80 กลุ่มสแปน ได้แก่ สแปน 40, 60 และ 80 ซึ่งได้วางแผนการทดลองเป็น

3.1.1 แบบ complete randomized design แบ่งการทดลองเป็น 6 treatment treatment ละ 4 ซ้ำ ซึ่งกำหนดให้ความเข้มข้นของสารโมโนกลีเซอร์ไรด์เป็นร้อยละ 0 (ตัวควบคุม), 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 ตามลำดับ

3.1.2 แบบ factorial design การทดลองประกอบด้วย 2 ตัวแปร (factor) แต่ละตัวแปรจะมีระดับของการทดลองไม่เท่ากันและทำการทดลองละ 2 ซ้ำ โดย

-ตัวแปรที่ 1 (factor A) คือ สารเซอร์แฟคแตนท์

-ตัวแปรที่ 2 (factor B) คือ ความเข้มข้นของสารเซอร์แฟคแตนท์ เป็นร้อยละ มี 6 ระดับ ได้แก่ 0 (ตัวควบคุม), 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 ตามลำดับ

สารเซอร์แฟคแตนท์ที่ได้วางแผนการทดลองแบบนี้มี 2 กลุ่ม คือ กลุ่มทวีน และกลุ่มสแปน

3.2 การเลือกสารเซอร์แฟคแตนท์ที่เหมาะสม

3.2.1 การเตรียมอาหารปลา

3.2.1.1 อุปกรณ์ในการเตรียมอาหารปลา ได้แก่ เครื่องอัดเม็ด (extruder) ที่ใช้แรงอัดจากมอเตอร์ขนาด $\frac{1}{2}$ แรงม้า ดังรูปที่ 3-1, หัวแม่แบบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 และ 5 มิลลิเมตร

3.2.1.2 วิธีปฏิบัติการ ในการเตรียมอาหารปลาแบบเม็ดโดยนำวัตถุดิบที่ประกอบด้วยรำละเอียด ยีสต์แห้ง และปลาป่นจืด มาร่อนผ่านตะแกรงขนาด 50 เมช (mesh) เพื่อลดขนาดให้เล็กลงและสม่ำเสมอก่อนนำมาผสมกับแป้งอัลฟ่า (แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านกระบวนการเจลาติไนส์มาแล้ว) วิตามินและเกลือแร่ให้เข้ากันก่อน สำหรับคุณค่าทางอาหารของปลาป่นจืดและรำละเอียด แสดงไว้ในภาคผนวก ก ตารางที่ ก-1 ส่วนปริมาณของส่วนประกอบแต่ละชนิดได้แสดงไว้ในตารางที่ ข-1 ในการคำนวณหาปริมาณของส่วนผสมที่เป็นตัวแปรนั้นใช้วิธี Square Method Balance ดังแสดงในภาคผนวก ข.

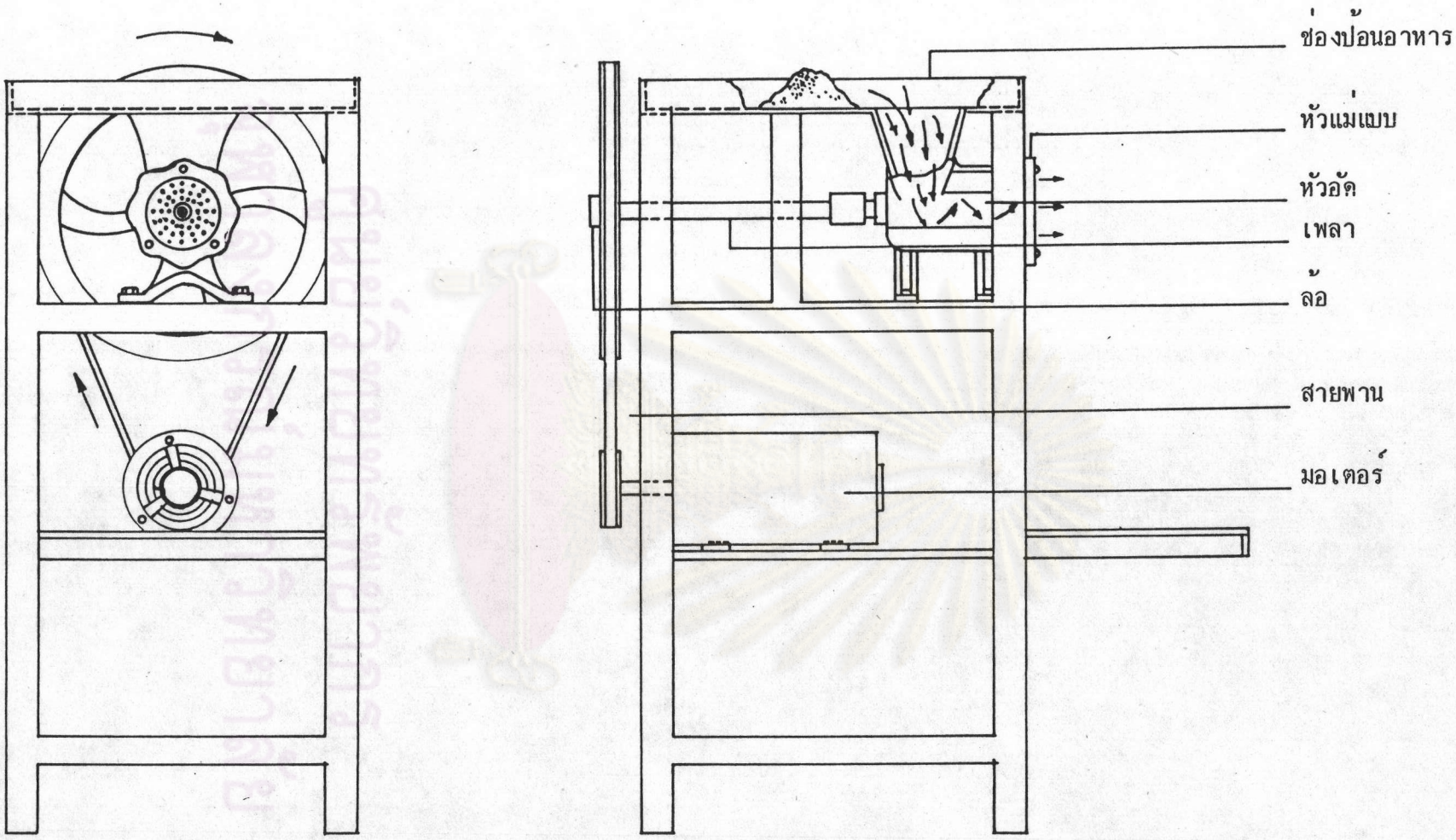
ขั้นตอนของการเตรียมอาหารปลาแบบเม็ดมีดังนี้ (5)

3.2.1.2.1 นำส่วนผสมต่าง ๆ ยกเว้นน้ำมันปลาและน้ำมาผสมให้เข้ากัน

3.2.1.2.2 เติมน้ำมันปลา คลุกเคล้าให้ทั่วแล้วจึงเติมสารเซอร์-แฟคแตนท์ตามชนิดและปริมาณที่จะใช้ ถ้าสารเซอร์แฟคแตนท์เป็นของแข็งก็ให้ละลายด้วยน้ำต้มเดือดบางส่วนก่อน แต่ถ้าเป็นของเหลวให้ใช้ผสมโดยตรง

3.2.1.2.3 เติมสารละลายโปตัสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 ลงในสูตร แล้วผสมให้เข้ากัน

3.2.1.2.4 นำอาหารผสมที่ได้ผ่านเข้าเครื่องอัดเม็ดที่มีหัวแม่แบบ (die) ขนาดที่ต้องการ อาหารที่ออกมาจะมีลักษณะเป็นแท่งยาวให้ตัดออกเป็นท่อนสั้น ๆ จากนั้นนำอาหารปลาที่ได้ไปทดสอบ



รูป 3-1 แสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ของเครื่องอัดเม็ด (extruder)

3.2.2 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ คุณสมบัติทางกายภาพของอาหารปลาที่จะทดสอบได้แก่

3.2.2.1 การวัดความเป็นกรด-ด่าง

3.2.2.2 การหาความหนาแน่น (relative density)

3.2.2.3 ความคงทนของอาหารในน้ำ (water stability)

3.2.2.4 อัตราการจม (relative velocity)

3.2.2.5 ความแข็งของอาหาร (hardness)

3.2.2.6 ความร่วนของอาหาร

3.2.2.1 การวัดความเป็นกรด-ด่าง (22) โดยผสมอาหารปลากับน้ำกลั่น (ที่เป็นกลาง) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 คนให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันและวัดความเป็นกรด-ด่างของของผสมนี้

3.2.2.2 การหาความหนาแน่น (relative density)(34) โดยนำขวดหาความหนาแน่น (pycnometer bottle) ขนาด 25 มิลลิลิตร ไปอบที่อุณหภูมิ 105-110 องศาเซลเซียส นานประมาณ 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดสิกเกเตอร์ (desiccator) ที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปชั่ง ถือเป็นน้ำหนักของขวดหาความหนาแน่น เอาตัวอย่างอาหารปลาที่จะทดสอบใส่ขวดหาความหนาแน่นชั่งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน(ประมาณ 10 กรัม) ถือเป็นน้ำหนักของขวดหาความหนาแน่นและตัวอย่าง จากนั้นเติมน้ำกลั่น (ที่เป็นกลาง) ลงในขวดหาความหนาแน่นที่มีตัวอย่างอาหารปลาแล้วจนเต็มขวด (พยายามไล่ฟองอากาศออกให้หมด) เช็ดน้ำรอบนอกขวดแล้วนำไปชั่ง ถือเป็นน้ำหนักของขวดหาความหนาแน่น ตัวอย่างอาหารและน้ำ เติมน้ำกลั่นจนเต็มขวดหาความหนาแน่นที่ไม่มีตัวอย่าง แล้วนำไปชั่งถือเป็นน้ำหนักของขวดหาความหนาแน่นและน้ำกลั่น ค่าที่ได้ทั้งหมดนำไปคำนวณในสูตร

$$\text{ความหนาแน่น (กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)} = \frac{(W_2 - W)}{(W_1 - W) - (W_3 - W_2)}$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักของขวดหาความหนาแน่นเป็นกรัม

W_1 คือ น้ำหนักของขวดหาความหนาแน่นและน้ำเป็นกรัม

W_2 คือ น้ำหนักของขวดหาความหนาแน่นและตัวอย่างอาหารเป็นกรัม

W_3 คือ น้ำหนักของขวดหาความหนาแน่น ตัวอย่างอาหารและน้ำ เป็นกรัม

3.2.2.3 ความคงทนของอาหารในน้ำ (water stability) หาตามวิธีการของ Hasting (11, 20) โดยชั่งอาหาร (ที่รู้ปริมาณความชื้นที่แน่นอนแล้ว) คัดเฉพาะที่มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตรใส่ตะแกรงอะลูมิเนียม 16 เมช ขนาด 6 × 9 ตารางเซนติเมตรที่มีขอบยกสูง 1.5 เซนติเมตร พร้อมฝาปิด ชั่งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 10 กรัม (น้ำหนักเปียก) ทำ 2 ซ้ำ (duplicate) ต่อ 1 ความเข้มข้น แล้วจุ่มน้ำในระดับความลึก 20 เซนติเมตรในอ่างแก้วขนาด 2 × 2 × 2 ลูกบาศก์ฟุต โดยแขวนกับไม้ที่พาดระหว่างขอบตู้ทดลอง (จะทำทั้งในน้ำนิ่งและน้ำที่มีการไหลเวียนด้วยการให้อากาศในปริมาณ 0.11 ปริมาตรน้ำต่อปริมาตรอากาศต่อนาที) เป็นเวลา 10 นาที นำตะแกรงขึ้นมาทิ้งไว้สักครู่ นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105–110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำออกมาใส่ในเดสิกเกเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปชั่ง ถือเป็นน้ำหนักของอาหารที่เหลือบนตะแกรงหลังจากจุ่มน้ำแล้ว นำค่าที่ได้ไปคำนวณในสูตร

$$\text{ความคงทนของอาหารในน้ำ (ร้อยละน้ำหนักแห้ง)} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่เหลือบนตะแกรง}}{\text{น้ำหนักอาหารแห้งเริ่มต้น}} \times 100\ \%$$

3.2.2.4 อัตราการจม (relative velocity) (34) โดยเลือกอาหารเม็ดที่มีน้ำหนักใกล้เคียงกัน ปล่อยลงน้ำที่อยู่ในคอลัมน์ (column) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 5 เซนติเมตร สูง 1 เมตร จับเวลาที่อาหารตกลงมาในช่วงความสูง 90 เซนติเมตร โดยทดลองในน้ำนิ่งและน้ำไหล นำค่าที่ได้ไปหาอัตราการจมจากสูตร

$$\text{อัตราการจม (เซนติเมตรต่อวินาที)} = \frac{\text{ระยะทางที่ปล่อยอาหาร (เซนติเมตร)}}{\text{เวลา (วินาที)}}$$

3.2.2.5 <u>ความแข็งของอาหาร</u> (hardness) หาความแข็งของอาหารด้วยเครื่องวัดความแข็ง (Un confined compressive strength, ELE) ที่มีสเกลตั้งแต่ 0.5 - 4.5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร มีเส้นผ่าศูนย์กลางหัวเข็ม 0.6 เซนติเมตร โดยวางปลายของเครื่องวัดความแข็งบนอาหารที่มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร กดจนกระทั่งอาหารเริ่มจะแตกจึงหยุด อ่านสเกลที่วัดได้ถือเป็นความแข็งของอาหาร

3.2.2.6 <u>ความร่วนของอาหาร</u> (19) ชั่งตัวอย่างอาหารที่มีน้ำหนักแน่นอนประมาณ 100 กรัม ใส่ตะแกรง 16 เมช ขนาด 15 × 15 ตารางเซนติเมตรที่มีขอบยกสูง 3 เซนติเมตร แล้วเขย่าไปมาประมาณ 2 นาที ชั่งเศษอาหารที่ลอดผ่านตะแกรงได้ นำค่าที่ได้ไปหาความร่วนของอาหารจากสูตร

$$\text{ความร่วนของอาหาร (ร้อยละน้ำหนักเปียก)} = \frac{\text{น้ำหนักเศษอาหารที่ลอดผ่านตะแกรง}}{\text{น้ำหนักอาหารเริ่มต้น}} \times 100\ \%$$

3.3 <u>การเตรียมอาหารปลาแบบเม็ดแห้ง</u>

เนื่องจากอาหารปลาแบบเม็ดเปียกมีปริมาณความชื้นสูงคือร้อยละ 30 ซึ่งจัดอยู่ในประเภท intermediate moisture food (มี a_w 0.7 - 0.9) และยังมีความเป็นกรด-ด่างต่ำ คือ pH 5.9 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (มี pH ในช่วง 4 - 4.5 ถึง 6.5 - 7.5) โดยเฉพาะเชื้อราและยีสต์ (a_w ของการเจริญเติบโตของเชื้อแต่ละชนิด ดังตารางที่ 3-1) อาหารปลาแบบเม็ดเปียกจึงถูกจุลินทรีย์ทำลายได้ง่าย วิธีที่จะยืดอายุการเก็บของอาหารประเภทนี้ คือ การลดปริมาณน้ำในอาหารลง (ลด a_w) ด้วยการระเหยเอาน้ำออกจากอาหาร ขณะเดียวกันก็พยายามรักษาคุณภาพของอาหารปลาให้คงเดิมหรือลดลงน้อยที่สุด (8, 16, 33) ดังนั้นในส่วนนี้จึงได้มีการ

ตารางที่ 3-1 แสดงระดับ water activity (a_w) ของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด (15,23).

ประเภทจุลินทรีย์	ระดับ a_w ขั้นต่ำ
บักเตรี	0.91
ยีสต์	0.88
รา	0.80
ราที่ทนสภาพแห้งแล้วได้ดี (xerophilic molds)	0.65

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แปรปริมาณความชื้นของอาหารปลาเป็นร้อยละ 10 และ 20 (33) โดยนำสารเซอร์แฟคแตนท์ที่ได้เลือกแล้วจากขั้นตอนที่ 3.1 และ 3.2 มาผสมลงในอาหารปลาแบบเม็ดแห้งแล้วทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ

3.3.1 การเตรียมอาหารปลาแบบเม็ดแห้ง ทำได้เช่นเดียวกับการเตรียมอาหารปลาแบบเม็ดเปียกในหัวข้อที่ 3.2.1 ตั้งแต่ข้อ 3.2.1.2.1 ถึง 3.2.1.2.4 โดยเติมสารเซอร์แฟคแตนท์ตามชนิดและปริมาณที่ได้เลือกแล้ว จากนั้นนำมาทำให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 105-110 องศาเซลเซียส จนได้ปริมาณความชื้นตามต้องการ (11)

3.3.2 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ ทำได้เช่นเดียวกับการทดสอบอาหารปลาแบบเม็ดเปียกในหัวข้อที่ 3.2.2 ตั้งแต่ข้อ 3.2.2.1 ถึง 3.2.2.6

3.4 การตรวจสอบคุณภาพของอาหารปลาในระหว่างการเก็บ

เพื่อตรวจดูว่าอาหารปลามีคุณสมบัติทางกายภาพเปลี่ยนแปลงหรือไม่ในระหว่างการเก็บ และเพื่อหาอายุการเก็บของอาหารปลาที่มีปริมาณความชื้นร้อยละ 10, 20 และ 30 โดยนำอาหารปลาที่มีการเติมสารเซอร์แฟคแตนท์ร่วมกับการใช้สารกันเสียพวกโปตัสเซียมซอร์เบตในปริมาณร้อยละ 0.3 (ต่อน้ำหนักเปียก) (2) มาตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางชีววิทยา

3.4.1 การตรวจสอบอาหารปลาทางกายภาพ โดยตรวจหาความเป็นกรด-ด่าง ความหนาแน่น ความคงทนของอาหารในน้ำ อัตราการจม ความแข็งของอาหาร และความร่วนของอาหาร ตามวิธีการในหัวข้อที่ 3.2.2 ตั้งแต่ข้อ 3.2.2.1 ถึง 3.2.2.6

3.4.2 การตรวจสอบอาหารปลาทางจุลชีววิทยา ได้ทำการวิเคราะห์

3.4.2.1 หาปริมาณบักเตรี (total viable plate count) ด้วยวิธี pour plate (18, 26) ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม นำมาทำให้เจือจางแบบอนุกรม (serial dilution) ด้วยน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นใช้ปิเปตขนาด

1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายเจือจางที่ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} มาใส่ในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร ทำความเจือจางละ 3 ซ้ำ แล้วเทอาหาร PCA (plate count agar) ที่ฆ่าเชื้อแล้วลงใน plate ปราศจากเชื้อ จากนั้นทำให้สารละลายผสมกับอาหาร โดยหมุนจานไปทางซ้าย-ขวา, หน้า-หลัง จนเข้ากันดี แล้วปล่อยให้แข็งตัว เอาไปบ่มที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง จึงตรวจนับจำนวนเซลจุลินทรีย์จากจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีขึ้นระหว่าง 30 - 300 โคโลนี กรณีที่ไม่มี plate ใดที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30 - 300 ให้หาค่าโคโลนีต่อกรัมจาก plate ที่มีจำนวนใกล้เคียง 30 - 300 มากที่สุด

3.4.2.2 <u>หาปริมาณยีสต์และรา</u> (total yeast and mold count) ด้วยวิธี spread plate (18) ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม นำมาทำให้เจือจางแบบอนุกรม (serial dilution) ด้วยน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายเจือจางที่ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} มาใส่ในจานเพาะเชื้อที่ได้เท PDA (potato dextrose agar) ที่ฆ่าเชื้อและได้ทิ้งให้ผิวหน้าของ agar แข็งแล้ว จานละ 1 มิลลิลิตร ทำความเจือจางละ 3 ซ้ำ จากนั้นใช้หลอดแก้วรูปตัว L ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยจุ่มแอลกอฮอล์และลนไฟทิ้งไว้ให้เย็นสักครู่ แล้วเกลี่ยสารละลายเจือจางของเชื้อให้กระจายทั่วผิวหน้าของอาหาร เอาไปบ่มที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง จึงตรวจนับจำนวนเซลจุลินทรีย์จากจานเพาะเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย