บทที่ 3

การทดลอง

3.1 การศึกษาสูตรและกรรมวิธี

3.1.1 วัตถุดิบ

เนื้อหมูส่วนสะโพกที่ยังไม่ผ่านการแช่แข็ง (บริษัท Fresh Food)

มันหมูจากส่วนหลัง

เกลือแกง

น้ำตาลทราย

sodium nitrite

สารผสม phosphate (Accord บริษัท Griffith Laboratory ประเทศไทย จำกัด)

สารผสม erythorbate (Regal base บริษัท Griffith Laboratory ประเทศไทย จำกัด)

น้ำแข็งบด

ไส้บรรจุชนิดเซลลูโลส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.5 ซม. (FRO 75/50 บริษัท Vicchi International ประเทศไทย จำกัด)

ด้ายกลุ่มสำหรับผูกไส้กรอก

ชานอ้อย หรือ ซังข้าวโพด (วัสดุซึ่งใช้เป็นแหล่งควัน)

3.1.2 เครื่องมือในการผลิต

เครื่องบดเนื้อ (Kenwood, Model A 907 D)

เครื่องสับนวด (Moulinex, Model 588)

เครื่องบรรจุไส้ (Miiller)

เครื่องชั่งละเอียดและเครื่องชั่งหยาบ

เครื่องนวดผสม (กิตติวัฒนา ประเทศไทย)

ตู้รมควัน

ห้องเย็น (อุณหภูมิ 0-4 °ซ.)

3.1.3 การศึกษาสูตรที่เหมาะสม

ทดลองแปรปริมาณเกลือเพื่อหาระดับที่ผู้บริโภคยอมรับ โดยแปรปริมาณเกลือเป็น 2 ระดับ คือ 2 และ 2.5% ส่วนผสมอื่นที่กำหนดให้คงที่ ได้แก่ sodium nitrite 125 ppm., accord 0.3%, regal base 0.5%, น้ำตาล 2.2% โดยที่ปริมาณสารเหล่านี้จะคำนวณเมื่อเทียบกับปริมาณเนื้อและมัน 1,100 กรัม สำหรับ regal base ประกอบด้วย erythorbate 2% และเกลือ 49% ดังนั้นปริมาณเกลือใน regal base จะต้องนำมาหักออกจากปริมาณเกลือที่จะใช้จริง เพื่อให้ได้ปริมาณเกลือคงที่เป็น 2 และ 2.5% (วิธีคำนวณมีแสดงในภาคผนวก ก)

ตารางที่ 3.1 สูตรการผลิตแฮมอัดเมื่อแปรปริมาณเกลือ

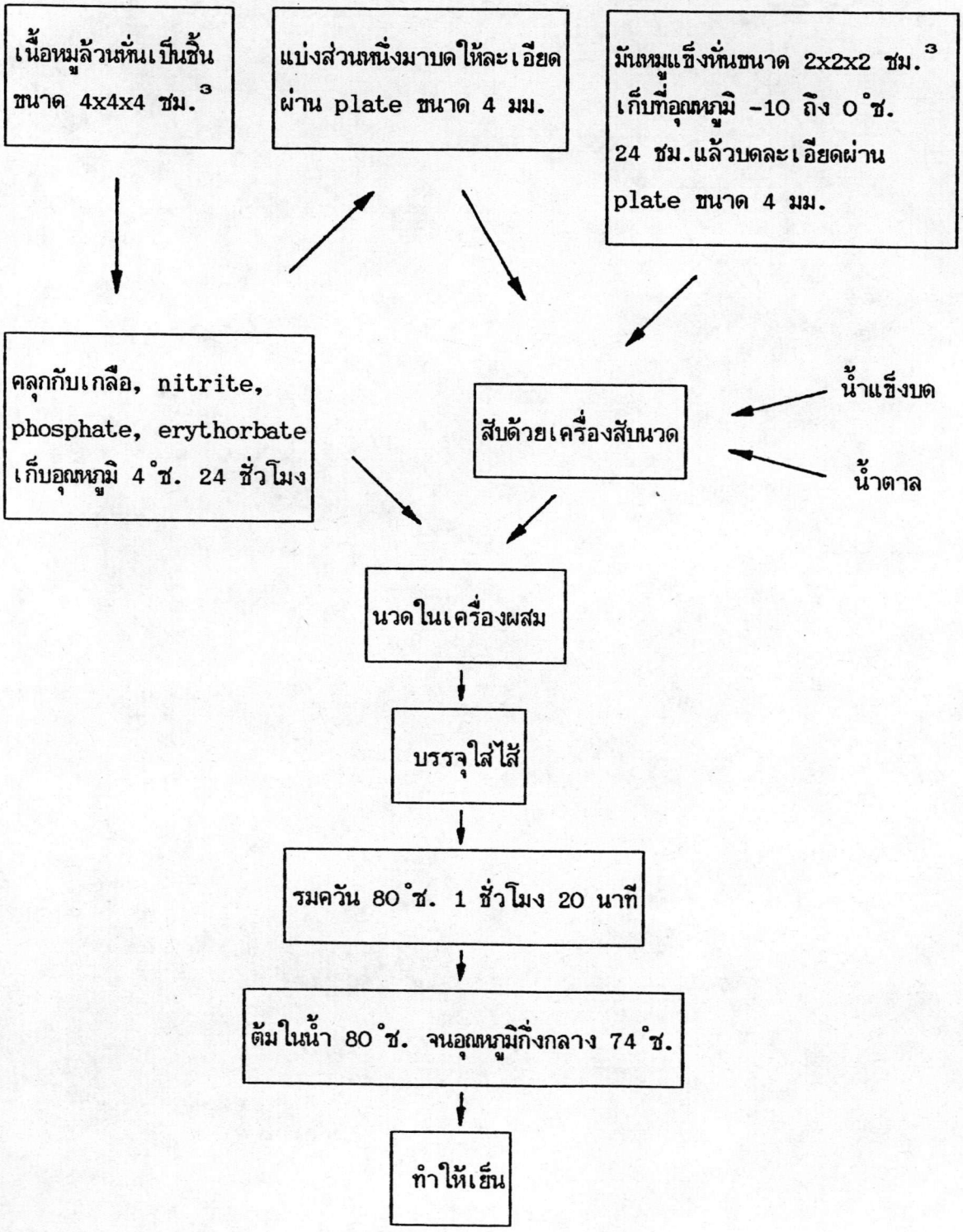
ส่วนประกอบ	น้ำหนัก (กรัม)	
	สูตร 1	สูตร 2
เนื้อสุกร	900	900
เนื้อสุกรบด	100	100
มันสุกร	100	100
เกลือ*	19.3	24.8
sodium nitrite*	0.1375	0.1375
accord*	3.3	3.3
regal base*	5.5	5.5
น้ำตาล*	21.5	21.5

* ปริมาณสารเมื่อเทียบกับปริมาณเนื้อและมัน 1,100 กรัม คิดเป็น เกลือ 2 และ 2.5% ตามลำดับ sodium nitrite 125 ppm. accord 0.3% regal base 0.5% น้ำตาล 2.2%

013795

3.1.4 การศึกษากรรมวิธีผลิต

กระบวนการผลิตแฮมอัดโดยวิธีเคียวแบบแห้ง มีดังต่อไปนี้



รายละเอียดของแต่ละขั้นตอนมีดังต่อไปนี้

ล้างทำความสะอาด ตัดแต่ง เนื้อหมูและมันหมูแข็ง เนื้อหมูแยกส่วนที่เป็นเอ็นและมันออก แล้วนำมาหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัสประมาณ 4x4x4 ซม.^{3} มันหมูหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 2x2x2 ซม.^{3} จากนั้นเก็บมันหมูที่อุณหภูมิ -10 ° ถึง 0 °ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บดมันหมูผ่าน plate ขนาด 4 มม. ผสมเนื้อหมูที่หั่นแล้วกับเกลือ nitrite, phosphate และ erythorbate ใช้ส่วนผสมตามสูตรที่สรุปได้จากข้อ 3.1.3 นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบ่งเนื้อหมูที่เตรียมไว้มาส่วนหนึ่ง บดผ่าน plate ขนาด 4 มม. เติมมันหมูแล้วสับนวดเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำตาลและน้ำแข็งบดประมาณ 30 กรัม สับจนได้อุณหภูมิสุดท้าย 12 -14 °ซ. นำเนื้อหมูส่วนที่เหลือมานวดในเครื่องผสม ใช้ความเร็วต่ำจนกว่าเนื้อภายนอกจะนวม (ใช้เวลาประมาณ 5 นาที) จากนั้นเติมส่วนผสมที่สับไว้และผสมต่อไปอีกเป็นเวลา 2 นาที บรรจุส่วนผสมที่เตรียมไว้ในไส้บรรจุ ซึ่งได้มัดปากถุงด้านหนึ่งและแช่น้ำให้นิ่มแล้ว โดยใช้เครื่องบรรจุไส้ บรรจุโดยให้มีช่องว่างอากาศน้อยที่สุดแล้วแขวนไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นนำเข้าตู้รมควัน อบที่อุณหภูมิ 80 °ซ. เป็นเวลา 20 นาที แล้วรมควันจากชานอ้อยหรือซังข้าวโพด 1 ชั่วโมง นำมาต้มในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 °ซ. จนอุณหภูมิภายในเป็น 73 -74 °ซ. ซึ่งใช้เวลาประมาณ 45 นาที หลังต้มตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเย็น

3.1.5 เกณฑ์ตัดสินคุณภาพของผลิตภัณฑ์

ทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยใช้แบบทดสอบชนิด hedonic scale ซึ่งแบ่งคะแนนเป็น 9 ระดับ (แสดงในภาคผนวก ข) ใช้ผู้ทดสอบชนิดผู้บริโภคทั่วไป 20 คน ต่อ 1 ซ้ำ สมบัติที่ตรวจสอบได้แก่ สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และการยอมรับรวม ตัวเลขที่ได้นำไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Completely randomized design (แสดงในภาคผนวก ง-1)

3.2 การศึกษาการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน

3.2.1 อุปกรณ์

กระป๋องเคลือบ lacquer ชนิด epoxy-phenolic ขนาด 307x113

thermocouple

digital recorder procos-VII (Chino, Type DR 015)

vertical retort

เครื่องปิดกระป๋องระบบสุญญากาศ (Shinl, Type S-C 17 V)

เครื่องเปิดกระป๋อง

3.2.2 วิธีทดลอง

เตรียมแฮมอัดโดยใช้วิธีตามข้อ 3.1.4 ถึงขั้นตอนการรมควัน แล้วหั่นให้ได้ขนาด 3.8 ซม. บรรจุในกระป๋อง โดยมีน้ำหนักประมาณ 190 กรัม ปิดกระป๋องด้วยเครื่องปิดกระป๋องระบบสุญญากาศที่ความดัน 65-70 ซม.ปรอท ฆ่าเชื้อใน retort ที่อุณหภูมิ 110 °ซ. โดยไล่อากาศใน retort เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นฆ่าเชื้อต่อไปตามเวลาที่กำหนดจนได้ค่า F_0 ที่ต้องการ

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า ประสิทธิภาพของ retort ที่ใช้ไม่สามารถควบคุมให้อุณหภูมิคงที่ตลอดเวลา และไม่สามารถควบคุมความเร็วของน้ำที่ใช้ในการทำให้เย็น จึงต้องให้ความร้อนเพื่อฆ่าเชื้อไปพร้อมกับการบันทึกอุณหภูมิและคำนวณค่า F_0 กรณีหาค่า F_0 เจาะรูที่ด้านข้างกระป๋องเพื่อใส่ probe ของลวด thermocouple ให้ปลาย thermocouple อยู่กึ่งกลางก้อนแฮมซึ่งอยู่กึ่งกลางกระป๋อง โดยมี recorder บันทึกอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์ที่เวลาต่าง ๆ ใน retort ที่อุณหภูมิ 110 °ซ. คำนวณค่า F_0 โดยวิธี General method for determining the lethality of a process (33) (แสดงในภาคผนวก ฉ) กำหนดให้ Z = 18 °ฟ. ไปพร้อมกับการวัดอุณหภูมิกึ่งกลางก้อนแฮม ทำการฆ่าเชื้อเพื่อให้ได้ F_0 จากการให้ความร้อนรวมกับ F_0 จากการทำให้เย็น มีค่าประมาณ 1 นาที จากการศึกษาเบื้องต้นสามารถพบค่า F_0 จากการทำให้เย็นได้คร่าว ๆ ฉะนั้นในระหว่างการทดลอง เมื่อค่า F_0 ช่วงการให้ความร้อนมีค่าทำให้ F_0 รวมประมาณ 1 นาที ก็จะปิดไอน้ำ แล้วทำให้กระป๋องเย็นใน retort วัดอุณหภูมิกึ่งกลางที่ลดลง คำนวณค่า F_0 รวม จากการให้ความร้อนและการทำให้เย็น ซึ่งจากการทดลอง 2 ครั้ง ได้ค่า F_0 เป็น 2 ค่าคือ 1.49 กับ 1.07 นาที

3.2.3 เกณฑ์ตัดสินคุณภาพผลิตภัณฑ์

ทดสอบผลิตภัณฑ์ทางประสาทสัมผัส ใช้วิธีตามข้อ 3.1.5 วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ทางสถิติแบบ Randomized complete block analysis (แสดงในภาคผนวก ง-2)

3.3 การศึกษาปริมาณไนไตรท์ที่เหมาะสม

3.3.1 อุปกรณ์

กระป๋องเคลือบ lacquer ชนิด epoxy-phenolic ขนาด 307x113

thermocouple

digital recorder procos-VII (Chino, Type DR 015)

vertical retort

เครื่องปิดกระป๋องระบบสุญญากาศ (Shinl, Type S-C 17V)

เครื่องเปิดกระป๋อง

ตู้ถ่ายเชื้อ

refrigerated centrifuge (Damon/IEC, Model B-20A)

เข็มฉีดยาปริมาตร 1.0 มม. ปลอดเชื้อ

spore suspension ของ PA 3679 (36)

fluid thioglycollate medium (36) (แสดงในภาคผนวก ค-1)

cooked meat medium (แสดงในภาคผนวก ค-2)

3.3.2 วิธีทดลอง

แผนภูมิการทดลองมีดังต่อไปนี้

เคียวเนื้อหมูโดยใช้ไนไตรท์ 5 ระดับคือ 0 125 200 300 และ 400 ppm.

ผลิตแฮมอัดตามข้อ 3.1.4 ถึงขั้นตอนการรมควัน ในแต่ละระดับของไนไตรท์ตรวจปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (37) และนับสปอร์ของ putrefactive anaerobe (37) (แสดงในภาคผนวก ค-2)

3.3.2.1 ศึกษาผลของระดับไนไตรท์ต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์

3.3.2.2 ศึกษาผลของระดับไนไตรท์ต่อ PA 3679

วิธีเตรียมสปอร์ PA 3679

อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมโดยนำหัวใจวัวมาแล่ไขมันและเอ็นออก บดหยาบ ๆ ในเครื่องบด ชั่งน้ำหนัก 454 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือดแล้วปล่อยให้เดือดช้า ๆ เป็นเวลา 1

ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองขณะร้อนผ่านสำลีเพื่อเอากากหยาบออก กรองของเหลวที่ได้อีกครั้งภายใต้สุญญากาศผ่านกระดาษกรอง Whatman #4 แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร ของเหลวที่ได้แต่ละลิตรจะเติม tryptone 10 กรัม gelatin 10 กรัม glucose 0.5 กรัม dibasic potassium phosphate 4 กรัม และ sodium citrate 3 กรัม ให้ความร้อนจนละลายเข้ากันดี จึงเติม isoelectric casein 5 กรัม ให้ความร้อนต่อจนสารละลาย ปรับ pH เป็น 8-9 ด้วยสารละลาย sodium hydroxide 5% เทของเหลวที่ได้ในหลอดหลอดละ 5 มล. 1 หลอด หลอดละ 9 มล. 2 หลอด หลอดละ 18 มล. 2 หลอด เทใส่ขวดผนังตรง 150 มล. 1 ขวด และ 500 มล. 1 ขวด ใส่เศษหัวใจวัวที่ได้จากการกรองครั้งแรกในหลอดและขวดให้สูงประมาณ 2-3 ซม. ปิดฝาแล้วฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ. เป็นเวลา 20 นาที

การใส่เชื้อและบ่มเชื้อ จะนำหลอด lyophilized ของ PA 3679 มาเคาะในตู้ถ่ายเชื้อ ใช้ pasteur pipette ดูดอาหารจากหลอด 5 มล. ที่เตรียมไว้มาเล็กน้อยใส่ในเชื้อแล้วดูดกลับไปใส่ในหลอดอาหารเดิม บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ. นาน 48 ชั่วโมง จะได้ stock spore suspension จากนั้นดูดเชื้อมา 0.1 มล. ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 9 มล. จำนวน 2 หลอด เททับด้วย paraffin เหลว นำหลอดไป heat shock ที่อุณหภูมิ 82.2 ° ซ. นาน 13 นาที แล้วทำให้เย็น บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 18 ชม. ดูดเชื้อแต่ละหลอดปริมาตร 2 มล. ใส่ในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 18 มล. 2 หลอด เททับด้วย paraffin เหลว บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 4 ชม. แล้วเทเชื้อทั้ง 2 หลอดในอาหาร 150 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ. นาน 3 ชั่วโมง เทเชื้อทั้งหมดลงในขวดที่มีอาหาร 500 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ. นาน 2 สัปดาห์ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 20 °ซ. อีก 1 สัปดาห์

การแยกสปอร์ทุกขั้นตอนทำอย่างปลอดเชื้อ กรองอาหารที่เลี้ยงสปอร์ไว้ผ่านสำลี 4 ชั้น เพื่อแยกเอากากหยาบออก เท filtrate ใส่ขวด centrifuge ขนาด 250 มล. ประมาณ 3/4 ของขวด centrifuge ใน refrigerated centrifuge ที่อุณหภูมิ 0 °ซ. ด้วยอัตราเร็ว 8,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมสารละลาย phosphate buffer 1/15 M (pH 7.0) (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ค-1) ประมาณ 50 มล. ใช้แท่งแก้วคนตะกอนให้กระจายแล้วเทส่วนผสมมารวมกันบางขวดเพื่อให้จำนวนขวดลดลง centrifuge อีกครั้งเช่นเดิม จากนั้นล้างตะกอนเช่นนี้อีก 1 ครั้ง เทส่วนใสทิ้ง คนตะกอนในสารละลาย phosphate buffer 1/15 M แล้วเทของเหลวทั้งหมดในขวดแก้วซึ่งมีฝาเกลียวและ glass beads สูงประมาณ 1 ซม. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ.

3.3.2.1 <u>การศึกษาผลของระดับไนไตรท์ต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์</u>

หั่นแฮมรมควันให้ได้ขนาด 3.8 ซม. บรรจุในกระป๋อง โดยมีน้ำหนักประมาณ 190 กรัม จำนวน 58 กระป๋อง ในแต่ละระดับของไนไตรท์ ปิดกระป๋องและฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2 โดยได้ค่า F_0 เป็น 2 ค่า คือ 1.49 และ 1.07 นาที เก็บแฮมบรรจุกระป๋องไว้ที่อุณหภูมิห้อง

วิเคราะห์คุณภาพของแฮมบรรจุกระป๋องโดยตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ คือ สุญญากาศ น้ำหนักบรรจุ น้ำหนักสุทธิ และ double seam (38) (แสดงในภาคผนวก ค-3) นับจำนวนกระป๋องบวมเมื่อเก็บรักษา 10 เดือน ที่ระดับความเข้มข้นไนไตรท์ต่าง ๆ ตรวจสอบ pH (39) วิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตกค้าง (40) ที่เวลาเก็บต่าง ๆ วิเคราะห์ nitrosamine (41) ที่ระดับไนไตรท์ 300 และ 400 ppm.ภายหลังจากเก็บตัวอย่างได้ 4 เดือน วิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาโดยตรวจสอบ total plate count (37), thermophilic anaerobes (37), putrefactive anaerobes (37) และ "sulphide spoilage" thermophiles (37) จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ทางสถิติแบบ Factorial with complete block design โดยให้ข้อมูลในแต่ละ F_0 เป็นปัจจัยในการจัด block (แสดงในภาคผนวก ง-3) วิเคราะห์ผลของปริมาณไนไตรท์ที่เติมต่อปริมาณไนไตรท์ตกค้าง ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อปริมาณไนไตรท์ตกค้าง และวิเคราะห์ความแตกต่างภายในแต่ละปัจจัยโดยวิธี Duncan's multiple range test (42)

3.3.2.2 <u>การศึกษาผลของระดับไนไตรท์ต่อ PA 3679 ในแฮมบรรจุกระป๋อง</u>

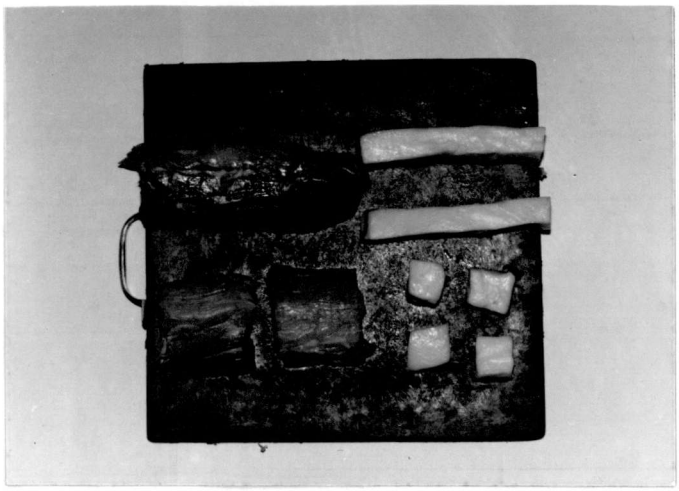
หั่นแฮมรมควันให้ได้ขนาด 3.8 ซม. บรรจุในกระป๋อง 25 กระป๋อง ในแต่ละระดับของไนไตรท์ นำ spore suspension ของ PA 3679 ไปทำให้เจือจาง และ heat shock ที่อุณหภูมิ 82.2°ซ. เป็นเวลา 13 นาที แล้วใช้เข็มฉีดยาปลอดเชื้อดูด spore suspension ฉีดใส่แฮมในกระป๋องในตู้ถ่ายเชื้อ ปริมาตร 0.2 มล. โดยให้ปลายเข็มฉีดยาอยู่ที่จุดกึ่งกลางของก้อนแฮม ซึ่งตรงกับจุดกึ่งกลางของกระป๋องด้วย ให้ได้สปอร์ประมาณ 10^4 สปอร์ต่อกระป๋อง (30) ปิดกระป๋องและฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2 โดยได้ค่า F_0 1.27 นาที เก็บแฮมบรรจุกระป๋องไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบจำนวนสปอร์ PA 3679 ที่ใส่เข้าไปจริง ๆ ใน fluid thioglycollate medium (36)

นับจำนวนกระป๋องบวมที่ระดับไนไตรท์ต่าง ๆ และตรวจ

putrefactive anaerobe ในกระป๋องบวม 2 กระป๋องแรกในแต่ละระดับไนไตรท์ (37) เป็นเวลา 6 เดือน จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ทางสถิติแบบ Factorial with complete block design โดยให้ข้อมูลในแต่ละซ้ำจำนวน 2 ซ้ำ เป็นปัจจัยในการจัด block วิเคราะห์ผลของปริมาณไนไตรท์ที่เติมต่อจำนวนกระป๋องที่บวม ผลของระยะการเก็บรักษาต่อจำนวนกระป๋องที่บวม และวิเคราะห์ผลของปริมาณไนไตรท์ที่เติมต่อเวลาที่กระป๋องเริ่มบวม โดยใช้ Completely randomized design จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างภายในแต่ละปัจจัยโดยวิธี Duncan's multiple range test (42)

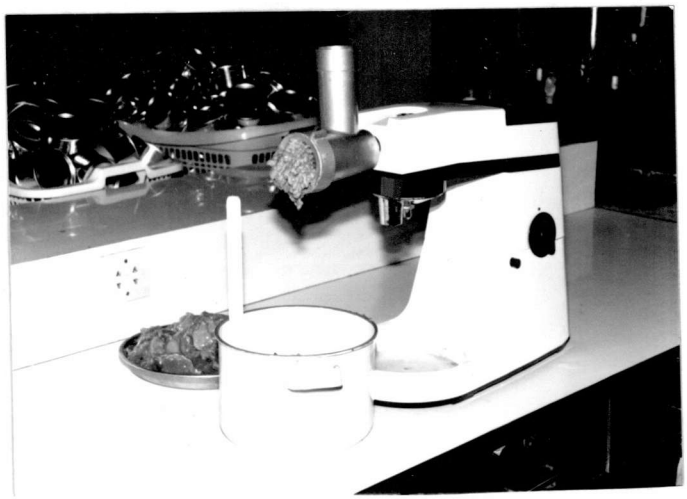
3.4 การวิเคราะห์คุณภาพของแฮมบรรจุกระป๋อง

เลือกตัวอย่างที่มีปริมาณไนไตรท์ ปริมาณ nitrosamine และมีการยับยั้งการบวมของกระป๋องเนื่องจาก PA 3679 ที่เหมาะสม มาทดสอบทางประสาทสัมผัส ใช้วิธีตามข้อ 3.2.3 นำตัวอย่างมาวิเคราะห์องค์ประกอบโดยประมาณของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ โปรตีน (43) ไขมัน (44) ความชื้น (44) เถ้า (44) sodium chloride (45) และ phosphate (44) (วิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ค-4)



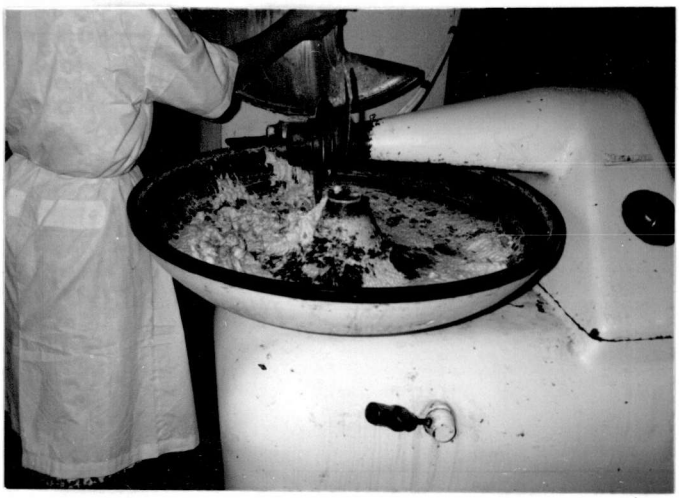
รูปที่ 1 การหั่นเนื้อหมูและมันหมู

รูปที่ 2 การเคียวเนื้อหมู



รูปที่ 3 การบดเนื้อหมูผ่านเครื่องบดเนื้อ

รูปที่ 4 การนวดเนื้อหมูในเครื่องนวดผสม



รูปที่ 5 การสับ เนื้อหมูบด มันหมูบด น้ำตาล น้ำแข็งบด ในเครื่องสับนวด

รูปที่ 6 การใส่ส่วนผสมที่สับแล้วในเนื้อหมูที่ผ่านการนวดแล้ว

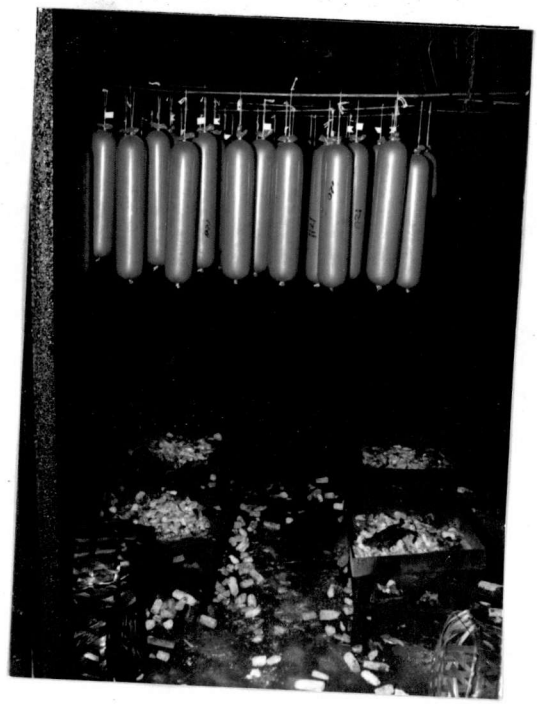
รูปที่ 7 แฮมก่อนบรรจุไส้

รูปที่ 8 การบรรจุใส่ไส้

รูปที่ 9 การมัดไส้

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10 ตู้รมควัน



รูปที่ 11 การรมควัน

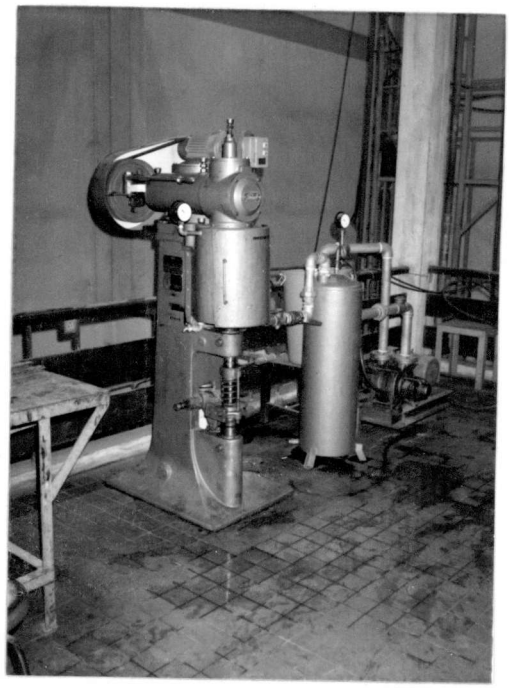
รูปที่ 12 การหั่นแฮม

รูปที่ 13 การบรรจุแฮมในกระป๋อง

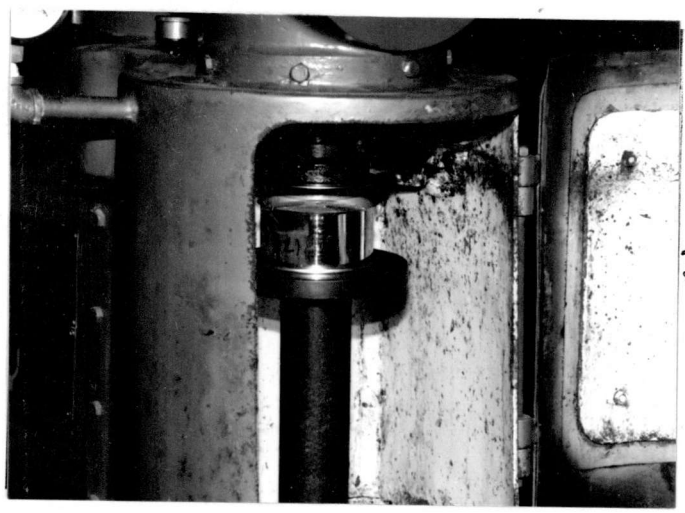
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 14 แฮมบรรจุกระป๋องก่อนผ่านความร้อน

รูปที่ 15 การฉีดสปอร์ PA 3679 ในแฮมบรรจุกระป๋อง



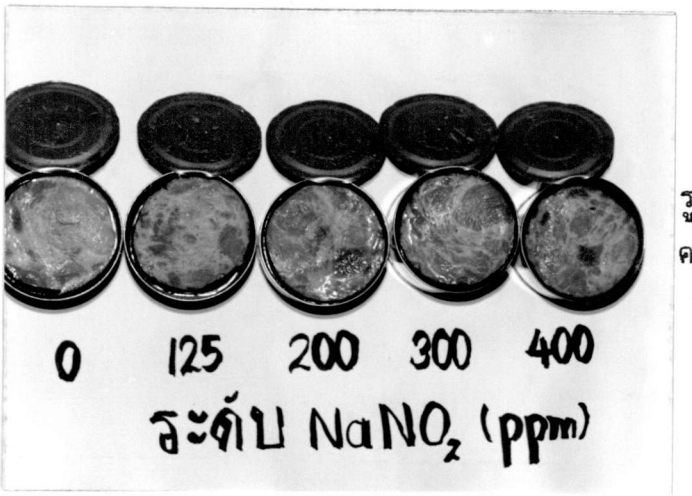
รูปที่ 16 เครื่องปิดกระป๋องระบบสุญญากาศ



รูปที่ 17 การปิดกระป๋อง

รูปที่ 18 vertical retort และเครื่องบันทึกอุณหภูมิ

รูปที่ 19 การเสียบ thermocouple ในการหาค่า F_o



รูปที่ 20 แฮมบรรจุกระป๋องหลังผ่านความร้อนที่ระดับไนไตรท์ต่าง ๆ