

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. กุ้งกุลาดำ (Black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius)) ขนาด 60 ตัว/กิโลกรัม
ซื้อมาจากแพกุ้งในจังหวัดสงขลา ซึ่งเป็นกุ้งที่จับได้จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งในภาคใต้ตอนล่าง และมีระยะเวลาตั้งแต่จับกุ้งจนถึงแพกุ้ง 12-24 ชั่วโมง โดยนำกุ้งที่ได้บรรจุในกล่องโฟมซึ่งวางกุ้ง
สลักับน้ำแข็งในอัตราส่วนกุ้งต่อน้ำแข็งคือ 1:2 ระหว่างขนส่งมายังห้องปฏิบัติการคณะ
อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง
2. สารเคมี เกรดสำหรับวิเคราะห์ทางเคมี
3. สารตัวกลางให้ความดัน ได้แก่ Caster oil ร้อยละ 20 ผสมกับ เอทานอล ร้อยละ 80
4. ไม้เทียมสำหรับบรรจุหุ้ม (Surimi casing) ชนิดพอลิไวนิลลิดีน (polyvinylidene) ขนาดเส้น
ผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร
5. ถูพลาสติกไนลอนชนิดพอลิเอทิลีน ขนาด 20 x 25 เซนติเมตร หนา 85 ไมโครเมตร จาก
บริษัทเอเชียอุตสาหกรรมโฟม จำกัด

อุปกรณ์

1. เครื่องอัดความดันสูง (High pressure) ยี่ห้อ SFP รุ่น S-FL-850-9-W ประเทศอังกฤษ
2. เครื่องปิดผนึกด้วยความร้อน ยี่ห้อ WINNER PACKING ประเทศไทย
3. เครื่องสับผสม ยี่ห้อ MOULINEX รุ่น MASTERCHEF ประเทศฝรั่งเศส
4. เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture Analyzer) ยี่ห้อ STABLE MICRO SYSTEM รุ่น TA-
XT2I ประเทศอังกฤษ
5. เครื่องวัดค่าสี ยี่ห้อ HUNTER LAB รุ่น Color Flex ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น UV-16001 ประเทศออสเตรเลีย
7. เครื่องพีเอชมิเตอร์ ยี่ห้อ FISHER SCIENTIFIC รุ่น DENVER 15 ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ ยี่ห้อ NISSEI รุ่น AM-8 ประเทศมาเลเซีย
9. เครื่องหมุนเหวี่ยง ยี่ห้อ SORVALL รุ่น RC-5B PLUS ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. เครื่อง Differential scanning calorimeter ยี่ห้อ PERKIN ELMER รุ่น DSC 7 ประเทศ
สหรัฐอเมริกา
11. ชุดอเล็กโตรโพรทีส ยี่ห้อ BIO-RAD รุ่น MINI-PROTEIN II ประเทศสหรัฐอเมริกา

12. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM 5800 LV ประเทศญี่ปุ่น
13. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียดชนิดนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น AB 204 ประเทศ สวิตเซอร์แลนด์
14. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ MEMMERT รุ่น W 350 ประเทศสหรัฐอเมริกา
15. กล้องถ่ายรูปดิจิตอล ยี่ห้อ SONY รุ่น DSC-P5 ประเทศญี่ปุ่น
16. อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ทางเคมี
17. อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
18. อุปกรณ์สำหรับทดสอบทางประสาทสัมผัส

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมวัตถุดิบ

เมื่อขนส่งกุ้งกุลาดำมาถึงห้องปฏิบัติการคณะอุตสาหกรรมเกษตร นำกุ้งมาล้างน้ำให้สะอาด ปอกเปลือก และบรรจุในถุงพลาสติกพอลิเอทิลีนแล้วเก็บในกล่องโฟมโดยมีอัตราส่วนกุ้งต่อน้ำแข็งเท่ากับ 1 : 2 เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 0-4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งทำการทดลอง

2. การวิเคราะห์คุณภาพของวัตถุดิบ

2.1 คุณภาพทางกายภาพของกุ้งกุลาดำ โดยการวัดค่าความเป็นกรดต่าง โดยใช้วิธีของ Lou (1998) ดังแสดงในภาคผนวก ข

2.2 คุณภาพทางเคมีของกุ้งกุลาดำ โดยการวิเคราะห์ปริมาณรวมของด่างที่ระเหยได้ และปริมาณไตรเมทิลอะมีน ด้วยวิธี Conway unit (Hasegawa, 1987) ดังแสดงในภาคผนวก ค

2.3 คุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน 5 คน ประเมินด้านสี ลักษณะเนื้อสัมผัส และการดมกลิ่น โดยการให้คะแนน (0 - 4 คะแนน) ดัดแปลงจากวิธีของ กฤษณา ไสภณพงษ์ (2538) ดังแสดงในภาคผนวก ท1

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีกุ้งกุลาดำ ดังนี้คือ ปริมาณโปรตีน ไขมัน ความชื้นและเถ้า (A.O.A.C., 1999) ดังแสดงในภาคผนวก ก

4. ศึกษาผลของความร้อนหรือความดันสูงต่อคุณสมบัติของโปรตีนกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำ

นำกุ้งกุลาดำจากข้อ 1 จำนวน 8 ตัว (110-120 กรัม) บรรจุในถุงไนลอนขนาด 4 X 16 เซนติเมตร ทำการปิดผนึกถุงแล้วแบ่งเป็น 2 ชุดการทดลอง ดังนี้

4.1 ศึกษาผลของการใช้ความดันสูงต่อคุณสมบัติของโปรตีนกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำ

นำกุ้งมาให้ความดันที่ระดับต่าง ๆ คือ 200, 400, 600 และ 800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ Caster oil ร้อยละ 20 ผสมกับ เอรานอล ร้อยละ 80 เป็นสารตัวกลางให้ความดัน แล้วนำตัวอย่างมาเก็บรักษาในน้ำแข็งจนกระทั่งนำไปตรวจสอบคุณสมบัติ ทำการตรวจสอบคุณสมบัติโดยเปรียบเทียบกับกุ้งสดดังนี้

4.1.1 ค่าแรงเฉือน (shear force) ดัดแปลงจากวิธีของ Srinivasan และคณะ (1997) โดยใช้เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส ดังแสดงในภาคผนวก ญ1

- 4.1.2 ค่าแรงกด (compression) ดัดแปลงจากวิธีของ Lanier (1992) โดยใช้เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส ดังแสดงในภาคผนวก ญ2
- 4.1.3 ตรวจสอบลักษณะความชุ่มโดยการสังเกต และวัดค่าสีโดยใช้เครื่องวัดค่าสีระบบ CIE Lab (L^* , a^* , b^*) ดังแสดงในภาคผนวก จ
- 4.1.4 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ดัดแปลงจากวิธีของ An และคณะ (1994) ดังแสดงในภาคผนวก ง2
- 4.1.5 การสูญเสียน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ โดยการชั่งน้ำหนักภายหลังการแปรรูปเทียบกับน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น ดังแสดงในภาคผนวก ฉ1
- 4.1.6 ตรวจสอบการละลายของโปรตีน ดัดแปลงจากวิธีของ Chawla และคณะ (1996) ดังแสดงในภาคผนวก จ1 โดยใช้สารละลายต่างๆ ดังนี้
- 4.1.6.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์
- 4.1.6.2 สารละลาย S1: สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) เข้มข้น 0.6 โมลาร์
- 4.1.6.3 สารละลาย S2: สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer) เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 8.0 ที่มี โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodiumdodecyl sulfate, SDS) เข้มข้นร้อยละ 1 (โดยมวลต่อปริมาตร)
- 4.1.6.4 สารละลาย S3: สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer) เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 8.0 ที่มี โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS) เข้มข้นร้อยละ 1 (โดยมวลต่อปริมาตร) และ สารละลายยูเรีย (Urea) เข้มข้น 8 โมลาร์
- 4.1.6.5 สารละลาย S4: สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer) เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 8.0 ที่มี โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS) เข้มข้นร้อยละ 1 (โดยมวลต่อปริมาตร) สารละลายยูเรีย (Urea) เข้มข้น 8 โมลาร์และสารละลายเบต้า-เมอแคปโตเอทานอล (β -mercaptoethanol) ร้อยละ 2 (โดยปริมาตรต่อปริมาตร)
- 4.1.7 รูปแบบโปรตีนไมโอไฟบริลโดยใช้วิธี SDS-PAGE ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970) ดังแสดงในภาคผนวก ข
- 4.1.8 การเปลี่ยนแปลงสภาพของโปรตีนด้วยความดันสูง โดยใช้เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) ดัดแปลงจากวิธีของ Srinivasan และคณะ (1997) ดังแสดงในภาคผนวก ฎ

- 4.1.9 ศึกษาอายุการเก็บรักษาโดยนำกุ้งที่ผ่านการให้ความดันและกึ่งสดมาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ทำการสุ่มตัวอย่างกุ้งทุก 3 วันเพื่อตรวจสอบคุณภาพ ดังนี้
- 4.1.9.1 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยวิธี Total plate count แบบ pour plate ดัดแปลง จากวิธีของ Speck (1976) ดังแสดงในภาคผนวก รฐ1
- 4.1.9.2 ปริมาณแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (psychrophilic count) โดยวิธี Total plate count แบบ pour plate ดัดแปลงจากวิธีของ Speck (1976) ดังแสดงใน ภาคผนวก รฐ2
- 4.1.9.3 ตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ดัดแปลงจากวิธีของ Speck (1976) ดังแสดงใน ภาคผนวก รฐ3
- 4.1.9.4 คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส ด้วยวิธี Multisample difference test (Rating) (Mailgaard *et al.*, 1999) โดยใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน จำนวน 15 คน ประเมินด้านกลิ่นผิดปกติ และลักษณะเนื้อสัมผัสด้วยมือ แบบประเมินคุณภาพ ดังแสดงในภาคผนวก ข2
- 4.1.9.5 ปริมาณ Thiobabuturic Acid Reactive Substance (TBARS) โดยใช้วิธี ของ Buege และ Aust (1998) ดังแสดงในภาคผนวก ข
- 4.1.9.6 การสูญเสียน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษาโดยการชั่งน้ำหนัก ผลิตภัณฑ์หลังเก็บรักษาเทียบกับน้ำหนักผลิตภัณฑ์ก่อนเก็บรักษา ดังแสดงใน ภาคผนวก ฉ1
- 4.1.9.7 การเปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏในระหว่างการเก็บรักษาในด้านสี และความชุ่ม โดยใช้กล้องถ่ายภาพดิจิทัล

4.2 ศึกษาผลของการใช้ความร้อนต่อคุณสมบัติของโปรตีนกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำ

นำกุ้งที่บรรจุลงในลอนและปิดผนึกถุงแล้วมาให้ความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือด นาน 2 นาที ทำให้เย็นทันทีแล้วนำตัวอย่างมาเก็บรักษาในน้ำแข็งจนกระทั่งนำไปตรวจสอบคุณสมบัติ เช่นเดียวกับข้อ 4.1 ยกเว้นข้อ 4.1.8 และ 4.1.9

5. ศึกษาผลของการใช้ความร้อน ความดันสูง และการใช้ความร้อนร่วมกับความดันสูงต่อการเกิดเจลของเนื้อกุ้งกุลาดำบด

นำกุ้งกุลาดำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และสับผสมด้วยเครื่องสับผสมที่อุณหภูมิประมาณ 2-4 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที แล้วเติมเกลือร้อยละ 2.5 ของเนื้อกุ้งแล้วสับผสมต่อไปโดยควบคุมอุณหภูมิไม่ให้เกิน 10 องศาเซลเซียส โดยขั้นตอนนี้ต้องใช้ระยะเวลาไม่เกิน 4 นาที แล้วบรรจุเนื้อกุ้งในใส่เทียมสำหรับบรรจุสุริมิ (ดัดแปลงจาก Nagashima *et al.*, 1994) แบ่งเป็น 3 ชุดการทดลองดังนี้

5.1 ศึกษาผลของการใช้ความร้อนที่มีต่อการเกิดเจล

นำโซลของเนื้อกุ้งบดมาให้ความร้อน 2 สภาวะ คือ

- ชุดการทดลองที่ 1 ให้ความร้อนแบบขั้นตอนเดียว (One-step heating) นำมาให้ความร้อนโดยการต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที
- ชุดการทดลองที่ 2 ให้ความร้อนแบบ 2 ขั้นตอน (Two-step heating) นำมาให้ความร้อนโดยการต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วให้ความร้อนอีกครั้งโดยการต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

ทำให้เย็นทันทีแล้วนำตัวอย่างมาเก็บรักษาในน้ำแข็งจนกระทั่งนำไปตรวจสอบคุณสมบัติ ดังนี้

- 5.1.1 ค่าแรงเจาะทะลุ (Breaking force) และระยะทางก่อนเจาะทะลุ (deformation) ดัดแปลงจากวิธีของ Lanier (1992) โดยใช้เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส ดังแสดงในภาคผนวก ญ3
- 5.1.2 ตรวจสอบลักษณะความขุ่นโดยการสังเกต และวัดค่าสี โดยใช้เครื่องวัดค่าสีระบบ CIE Lab (L^* , a^* , b^*) ดังแสดงในภาคผนวก ฉ
- 5.1.3 ความสามารถในการกัมน้ำโดยวิธีของ Jatuphong และคณะ (2000) ดังแสดงในภาคผนวก ฉ2
- 5.1.4 การสูญเสียน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ โดยการชั่งน้ำหนักภายหลังการแปรรูปเทียบกับน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น ดังแสดงในภาคผนวก ฉ1
- 5.1.5 ตรวจสอบการละลายของโปรตีน ดัดแปลงจากวิธีของ Chawla และคณะ (1996) โดยใช้สารละลายต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 4.1.6 ดังแสดงในภาคผนวก จ1
- 5.1.6 รูปแบบโปรตีนโมโนไฟบริลโดยวิธี SDS-PAGE ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970) ดังแสดงในภาคผนวก ช

5.2 ศึกษาผลของการใช้ความดันสูงที่มีต่อการเกิดเจล

นำโซลของเนื้อกึ่งบดที่บรรจุในไส้เทียมแล้วบรรจุในถุงไนลอน ปิดผนึก นำมาให้ความดันระดับต่าง ๆ คือ 200, 400, 600 และ 800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำตัวอย่างมาเก็บรักษาในน้ำแข็งจนกระทั่งนำไปตรวจสอบคุณสมบัติ เช่นเดียวกับข้อ 5.1

5.3 ศึกษาผลของการใช้ความร้อนร่วมกับความดันสูงที่มีต่อการเกิดเจล

นำโซลของเนื้อกึ่งบดที่บรรจุในไส้เทียมแล้วมาบรรจุในถุงไนลอน ปิดผนึกนำมาทำการทดลอง 2 สภาวะ คือ

- ชุดการทดลองที่ 1 นำมาให้ความดันที่ระดับ 200 และ 400 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาให้ความร้อนแบบขั้นตอนเดียว (One-step heating) โดยให้ความร้อนโดยการต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที
- ชุดการทดลองที่ 2 นำมาให้ความดันที่ระดับ 200 และ 400 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาให้ความร้อนแบบ 2 ขั้นตอน (Two-step heating) โดยให้ความร้อนโดยการต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำมาให้ความร้อนอีกครั้งโดยการต้มในน้ำที่ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

นำตัวอย่างมาเก็บรักษาในน้ำแข็งจนกระทั่งนำไปตรวจสอบคุณสมบัติ เช่นเดียวกับข้อ 5.1

เปรียบเทียบคุณลักษณะทางด้านเนื้อสัมผัสของโซลของเนื้อกึ่งบดที่ได้จากการทดลองในแต่ละสภาวะในขั้นตอนการศึกษาผลของการใช้ความร้อน ความดันสูง และความร้อนร่วมกับความดัน ในการทดลองข้อ 5.1, 5.2 และ 5.3 ตามลำดับ แล้วคัดเลือกสภาวะที่ทำให้เนื้อกึ่งบดที่มีค่าความแข็งแรงของเจลสูงที่สุด นำมาตรวจสอบโครงสร้างทางจุลภาคด้วยเครื่องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) โดยดัดแปลงวิธีของ Nip และ Moy (1988) ดังแสดงในภาคผนวกที่ ๗ เพื่อเปรียบเทียบโครงสร้างทางจุลภาคของเนื้อกึ่งบดที่เป็นผลมาจากกระบวนการแปรรูปที่แตกต่างกัน

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิจัยในข้อ 4 และ 5 วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง และการทดสอบทางประดาสัมผัสวางแผนการทดลองแบบบล็อกอย่างสมบูรณ์ (Randomized Completely Block Design, RCB) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองด้วย DMRT (Duncan's multiple range test) (จิราพร ชมพิบูล, 2532) โดยใช้โปรแกรม SPSS for Window Version 10.0